

Identifizierung von Signalstoffen und Sekundärmetaboliten aus Roseobakterien

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Alexander Neumann
aus Leipzig

1. Referentin oder Referent:	Professor Dr. Stefan Schulz
2. Referentin oder Referent:	Professor Dr. Thomas Lindel
eingereicht am:	24.03.2014
mündliche Prüfung (Disputation) am:	06.06.2014

Druckjahr 2014

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

D. Patzelt, H. Wang, I. Buchholz, M. Rohde, L. Gröbe, A. Neumann, S. Schulz, S. Pradella, R. Münch, D. Jahn, I. Wagner-Döbler, J. Tomasch, You are what you talk: quorum sensing induces individual morphologies and cell division modes in *Dinoroseobacter shibae*, *The ISME Journal*, **2013**, 7, 2274-2286.

A. Neumann, D. Patzelt, I. Wagner-Döbler, S. Schulz, Identification of new *N*-acylhomoserine lactone signalling compounds of *Dinoroseobacter shibae* DFL-12T by overexpression of *luxI* genes, *ChemBioChem*, **2013**, 17, 2355-2361.

M. Berger, A. Neumann, S. Schulz, M. Simon, T. Brinkhoff, Tropodithietic acid production in *Phaeobacter gallaeciensis* is regulated by *N*-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing, *J. Bacteriol.*, **2011**, 23, 6576-6585.

Tagungsbeiträge

A. Neumann, S. Schulz, Metabolites of marine bacteria of the *Roseobacter* clade, (Poster), 23. Irseer Naturstofftage der Gesellschaft für Chemische Technik und Biotechnologie e.V. (DECHEMA), Irsee (**2011**).

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	- 1 -
1.1 Die Familie der Roseobakterien	- 1 -
1.2 Quorum Sensing.....	- 6 -
1.3 N-Acylierte Homoserinlaktone.....	- 10 -
2. THEMENSTELLUNG	- 14 -
3. ERGEBNISSE	- 15 -
3.1 <i>Dinoroseobacter shibae</i> DFL12.....	- 15 -
3.1.1 Allgemeines	- 15 -
3.1.2 Signalmoleküle	- 17 -
3.1.3 Expression der <i>luxI</i> -Gene in <i>Echerichia coli</i>	- 18 -
3.1.4 <i>luxI</i> -Mutanten von <i>Dinoroseobacter shibae</i>	- 23 -
3.1.5 Vergleich AHLs im Voll- und Minimalmedium	- 28 -
3.1.6 $\Delta luxI$ -Mutanten von <i>Dinoroseobacter shibae</i>	- 30 -
3.1.7 Strukturaufklärung	- 33 -
3.1.8 Synthese der Homoserinlaktone aus <i>Dinoroseobacter shibae</i> Wildtyp	- 38 -
3.2 Co-Kultur von <i>Dinoroseobacter shibae</i> DFL12 mit Algen	- 50 -
3.2.1 <i>Prorocentrum minimum</i> CCMP1329	- 51 -
3.2.2 <i>Isochrysis galbana</i> CCMP1323	- 54 -
3.2.3 Co-Kultur von <i>Dinoroseobacter shibae</i> mit <i>Prorocentrum minimum</i>	- 55 -
3.2.4 Co-Kultur von <i>Dinoroseobacter shibae</i> mit <i>Isochrysis galbana</i>	- 57 -
3.2.5 Strukturaufklärung und Synthese der Phenylacetate	- 59 -

3.3	<i>Phaeobacter inhibens</i> DSM17395.....	- 65 -
3.3.1	Allgemeines	- 65 -
3.3.2	Antibiotikum.....	- 66 -
3.3.3	Signalmoleküle	- 69 -
3.3.4	Biosynthese des Antibiotikums	- 71 -
3.3.5	Zusammenhang zwischen Autoinducer und Antibiotikum.....	- 72 -
3.4	Identifizierung mittels GC/MS und HPLC/MS von extrazellulären Metaboliten der <i>Roseobacter</i> Gruppe	- 77 -
3.4.1	Fragmentierung in GC/MS.....	- 77 -
3.4.2	Fragmentierung in HPLC/MS.....	- 80 -
4.	ZUSAMMENFASSUNG.....	- 99 -
5.	EXPERIMENTELLER TEIL	- 104 -
5.1	Allgemeine Informationen.....	- 104 -
5.2	Derivatisierung von Naturproben	- 108 -
5.2.1	Silylierung mit MSTFA.....	- 108 -
5.2.2	Derivatisierung mit Ethylchlorformiat.....	- 108 -
5.2.3	Derivatisierung mit DMDS.....	- 108 -
5.3	Allgemeine Arbeitsvorschriften	- 109 -
5.3.1	Darstellung von <i>N</i> -Acyl-L-homoserinlaktone.....	- 109 -
5.3.2	Darstellung der alkylierten Phenylacetate	- 109 -
5.4	Synthesen	- 110 -
5.4.1	Darstellung von (Z)-Hexadec-9-en-1-ol (72).....	- 110 -
5.4.2	Darstellung von (Z)-Hexadec-9-enal (53)	- 111 -
5.4.3	Darstellung von (2 <i>E</i> , 11 <i>Z</i>)-Octadeca-2,11-diensäureethylester (54)	- 111 -

5.4.4	Darstellung von (2 <i>E</i> ,11 <i>Z</i>)-Octadeca-2,11-diensäure (56).....	- 112 -
5.4.5	Darstellung von L-Homoserinlaktone Hydrobromid (55)	- 113 -
5.4.6	Darstellung von (Z)- <i>N</i> -Octadeca-11-enoyl-L-homoserinlaktone (34)	- 113 -
5.4.7	Darstellung von (2 <i>E</i> ,11 <i>Z</i>)- <i>N</i> -Octadeca-2,11-dienoyl-L-homoserinlaktone (35)...	- 114 -
5.4.8	Darstellung von 7-Bromheptan-1-ol (59)	- 115 -
5.4.9	Darstellung von (7-Bromheptan-1-yloxy)(<i>tert</i> -butyl)dimethylsilan (57)	- 116 -
5.4.10	Darstellung von (7-Iodheptan-1-yloxy)trimethylsilan (58)	- 116 -
5.4.11	Darstellung von (Hexadec-9-en-1-yloxy)trimethylsilan (51)	- 117 -
5.4.12	Darstellung von Heptyltriphenylphosphoniumbromid (61).....	- 118 -
5.4.13	Darstellung von 9-((Tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)oxy)nonan-1-ol (65)	- 118 -
5.4.14	Darstellung von 9-((Tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)oxy)nonanal (63).....	- 119 -
5.4.15	Darstellung von (Z)-2-(Hexadec-9-en-1-yloxy)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran (64)	- 120 -
5.4.16	Darstellung von 3,5-Dimethylphenylacetat (93).....	- 120 -
5.4.17	Darstellung von 3-Ethyl-5-methylphenylacetat (94).....	- 121 -
6.	LITERATURVERZEICHNIS	- 122 -
7.	ABKÜRZUNGEN	- 127 -

1. Einleitung

1.1 Die Familie der Roseobakterien

Marine Bakterien sind in den letzten Jahren immer weiter zu einem Forschungsschwerpunkt geworden. Ihr Einfluss auf verschiedene Stoffwechselkreisläufe, wie dem des Schwefels, Kohlenstoffs und weiterer Elemente, ist erst in den letzten Jahren näher betrachtet worden und Bedarf noch weiterer Untersuchungen. Aufgrund des großen Einflusses der Ozeane und der darin enthaltenen Organismen auf das Weltklima, gerade in Bezug auf die globale Erwärmung und Verschmutzung, ist die Aufklärung der Funktion und Anpassung der Bakterien an diesen Lebensraum unerlässlich.^[1]

Roseobakterien zeigen eine sehr hohe Diversität, basierend auf der 16S rRNA lassen sie sich in neun verschiedene Stämme unterteilen.^[2] Dabei stellt der *Roseobacter* Stamm, welcher zu der α -3 Unterklasse der *Proteobacteria* gehört, eines der prominentesten marinen Gemeinschaften mit bis zu 20 % im Küstenbereich und bis zu 15 % im restlichen Meeresbereich dar.^{[2][3][4][5][6]} Die ersten Stämme sind erstmals 1991 beschrieben worden. Dabei handelte es sich um *Roseobacter denitrificans* und *Roseobacter litoralis*.^[7] Beide Bakterien besitzen ein pink-pigmentiertes Bakterienchlorophyll *a*, wobei weder das Pigment noch das Vorhandensein des Bakterienchlorophylls typisch für die *Roseobacter* ist.^{[8][9][10][11]} Sie kommen ausschließlich im marinen bzw. salzhaltigen Wasser nicht aber im Süßwasser oder im Erdboden vor.^{[12][13]} Die Population der Bakteriengruppe schwankt dabei je nach Jahreszeit, wobei die Population im Sommer am höchsten ist.^{[14][15]} Außerdem sinkt der Anteil der *Roseobacter* mit steigender Meerestiefe.^{[4][16]} Bakterien aus den *Roseobacter* Stämmen sind dabei sowohl als frei lebende Bakterien als auch an Partikel assoziiert beschrieben worden, sind aber vor allem mit Phytoplanktonblüten, Algenblüten, Grünalgen und Rotalgen anzutreffen.^{[17][18][19][20][21][22][23]} Andere *Roseobacter* wurden von Biofilmen^{[24][25]}, Kieselalgen^[26], Korallen^[27], arktischen und antarktischen Eis^{[28] [29]} isoliert.

Untersuchungen von verschiedenen marinen Sedimenten haben zudem ergeben, dass auch hier Bakterien dieser Stämme vorhanden sind.^{[30][31]}

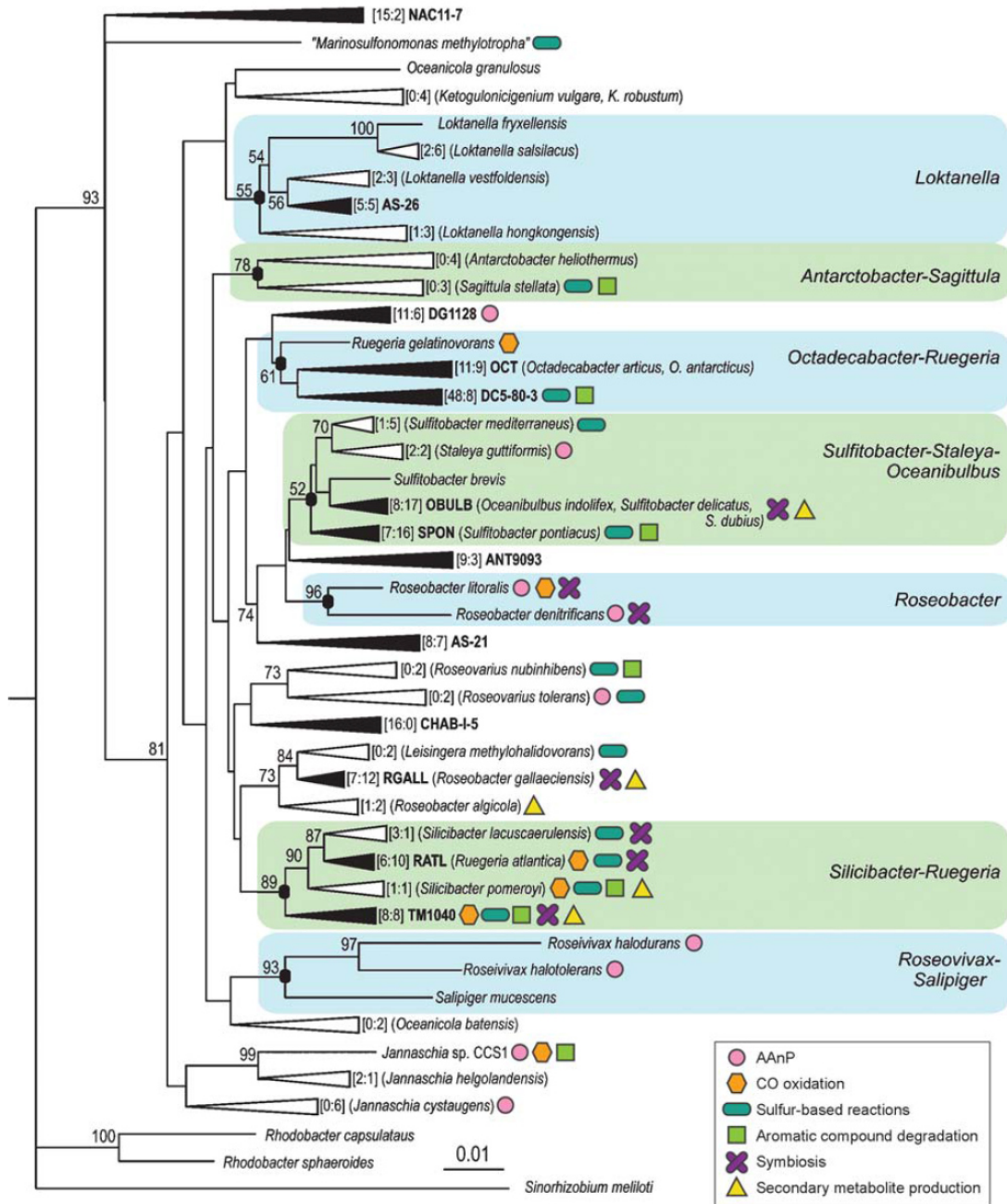


Abb. 1 *Roseobacter* Abstammung der 41 Hauptcluster (Hauptabstammungslinien sind hervorgehoben)^[32]

Zu den Besonderheiten dieser Bakteriengruppen gehören unter anderem der Schwefelmetabolismus, Kohlenmonooxid Oxidation, Produktion von bioaktiven sekundären Metaboliten, Abbau von aromatischen Verbindungen, Reduktion von Spurenmetallen, symbiotische und pathogene Beziehungen und Quorum Sensing. Allerdings sind nicht alle diese Eigenschaften in allen Vertretern der *Roseobacter* Gruppe enthalten.^[33]

Die ersten isolierten *Roseobacter* gehörten zu der Gruppe der aeroben anoxygenen Phototrophen (AAnPs).^[34] Diese sind in der Lage Energie ohne Entstehung von Sauerstoff aus der Photosynthese zu gewinnen. Die Vermutung, dass aufgrund der ersten isolierten Bakterien mit dieser Fähigkeit, es sich um ein Merkmal aller *Roseobacter* handelt, hat sich nicht bestätigt. Lediglich sieben der 41 *Roseobacter* Abstammungslinie gehören zu diesen Phototrophen.^[26] Durch die Fähigkeit der Nutzung von Licht zur Assimilation von organischen Stoffen, welche vorher nicht den marinen Bakterien zugeschrieben wurde, ermöglicht es den Bakterien ein verbessertes Wachstum und stellt somit eine interessante Anpassung an den marinen Lebensraum dar. Eine Bestätigung, ob alle *Roseobacter* photoheterotroph sind, steht noch aus.^[35]

Die Metabolisierung von organischen wie auch anorganischen Schwefel ist in 12 der 41 *Roseobacter* Abstammungslinien verbreitet. Es wurden zwei verschiedene Stoffwechselwege für den Abbau von Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP), einen von Algen produzierten Verbindung, identifiziert. DMSP spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Dimethylsulfid (DMS), eine der für das Klima sehr wichtigen Schwefelverbindung. Somit spielen die *Roseobacter* eine wichtige Rolle im globalen Schwefelkreis.^[36] Bei anderen *Roseobakterien* wurden die Fähigkeiten zur Transformation anderer schwefelhaltiger Verbindungen wie Dimethylsulfid, Methanthiol, Methansulfonat und Dimethylsulfoxid identifiziert.^{[37][38]} Da mehrere *Roseobacter* Stämme auch anorganischen Schwefel metabolisieren können, welches einen wichtigen Prozess in der Küsten- und Meeresökologie darstellt, ist die Aufklärung ihrer Bedeutung im globalen Kreislauf immens wichtig.^[39]

Ein sehr bedeutendes Merkmal der *Roseobacter* wurde anhand der Untersuchungen mit *Silicibacter pomeroyi* nachgewiesen und ist aufgrund nachfolgender genetischer Untersuchungen in sechs der 41 Hauptabstammungslinien identifiziert worden. Es handelt sich dabei um die Fähigkeit Kohlenmonooxid, ein Treibhausgas, welches durch die Einwirkung von Licht auf die organische Materie an der Meeresoberfläche entsteht, zu oxidieren. Die Verwendung von Kohlenmonooxid als Energiequelle zeigt einmal mehr, wie angepasst diese Bakterien an ihren Lebensraum sind und welche Rolle sie im globalen Kreislauf innehaben.^[40]

Der Abbau von aromatischen Verbindungen, welche vor allem in küstennahen Gewässern eine Rolle spielen, können ebenfalls durch eine Mehrzahl der bekannten *Roseobacter* Stämme durchgeführt werden. Dabei werden diese aromatischen Verbindungen, schwerpunktmäßig ist dabei die Umsetzung von Lignin gemeint, als Kohlenstoffquelle verwendet.^[41] Aber auch andere Verbindungen wie Phenol- oder Benzoessäurederivate können über verschiedene Stoffwechselwege abgebaut bzw. metabolisiert werden.^[42] Das Vorhandensein dieser Fähigkeit ist bisher in sieben der 41 Abstammungslinien nachgewiesen worden.

Zuletzt soll auf die Fähigkeit der Produktion von Sekundärmetaboliten näher eingegangen werden. Darunter zählen vor allem Verbindungen zur Kommunikation und zur Abwehr. *Oceanibulbus indolifex* ist nicht nur für die Produktion von Indolen bekannt, sondern produziert zusätzlich noch den antimikrobiellen Wirkstoff Tryptantrin (**1**).^[43] Von *Phaeobacter inhibens* DSM17395 ist das Antibiotika Tropodithiolsäure (**2a**, **2b**) bekannt.^[44] Ansonsten sind zwar weitere Metabolite von *Roseobacter* identifiziert worden, deren genaue Funktion und Wirkung ist aber bisher noch weitgehend ungeklärt.

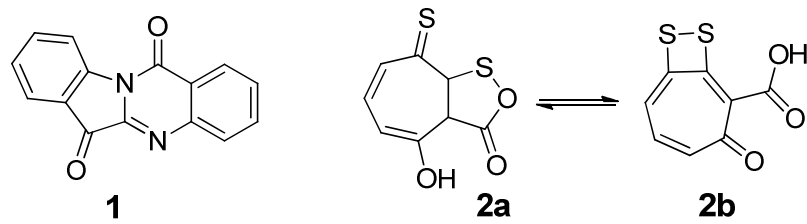


Abb. 2 Struktur von Trypantrin (1) und Tropodithietic acid (2a, 2b)

Da die Produktion von vielen Sekundärmetaboliten an die Fähigkeit geknüpft ist, eine symbiotische Beziehung mit einem Wirts-Organismus, meist einer Alge, einzugehen, schien sich lange Zeit nicht zu bestätigen.^[20] Einen Durchbruch gelang dabei der Arbeitsgruppe von CLARDY *et al*, welche *Phaeobacter gallaeciensis* BS107 zusammen mit der Mikroalge *Emiliania huxleyi* kultivierten und dabei die neuen Metabolite der Roseobakterizide (6, 7) identifizierten.^{[45][46]} Das vorgeschlagene Modell, welches dieser Interaktion zu Grunde liegt, ist in Abbildung 3 dargestellt.

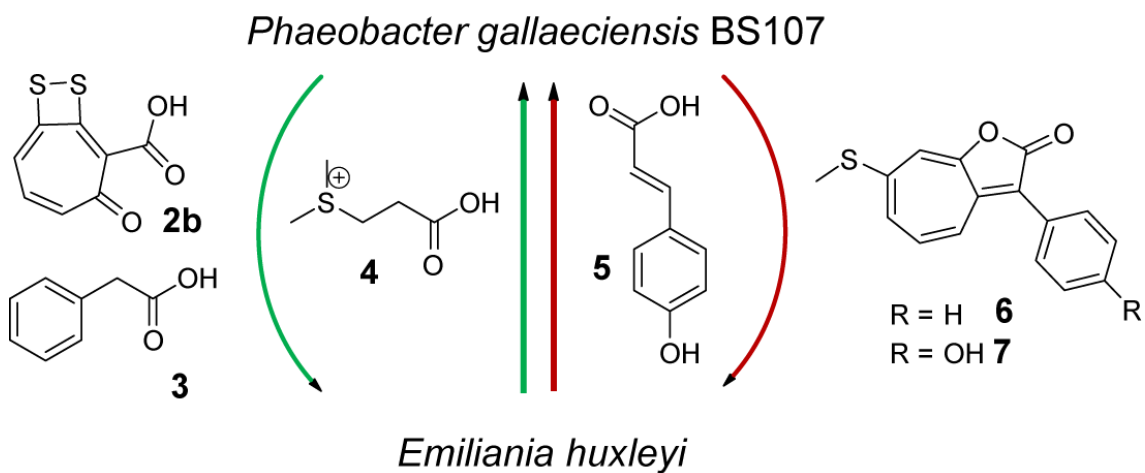


Abb. 3 Postuliertes Modell zur Interaktion zwischen *Phaeobacter gallaeciensis* und *Emiliania huxleyi*^[45]

Die symbiotische Beziehung beruht darauf, dass das Bakterium sowohl Wachstumsfaktoren 3 als auch Antibiotika 2b der Mikroalge zur Unterstützung und zum Schutz zur Verfügung stellt. Im Gegenzug stellt *E. huxleyi* DMSP (4) sowie eine Biofilmoberfläche bereit. Die symbiotische Beziehung wird durch die Freisetzung von

4-Hydroxymzimtsäure (**5**) unterbrochen, woraufhin *P. gallaeciensis* BS107 das Algizid **6** und **7** produziert. Weitere Roseobakterizide (Abb. 4) lassen sich durch die Zugabe von verschiedenen Lignin Vorstufen und Derivaten erhalten. Untersuchungen haben außerdem gezeigt, dass die Produktion dieser Sekundärmetabolite auf die *Phaeobacter gallaeciensis* Stämme beschränkt ist.

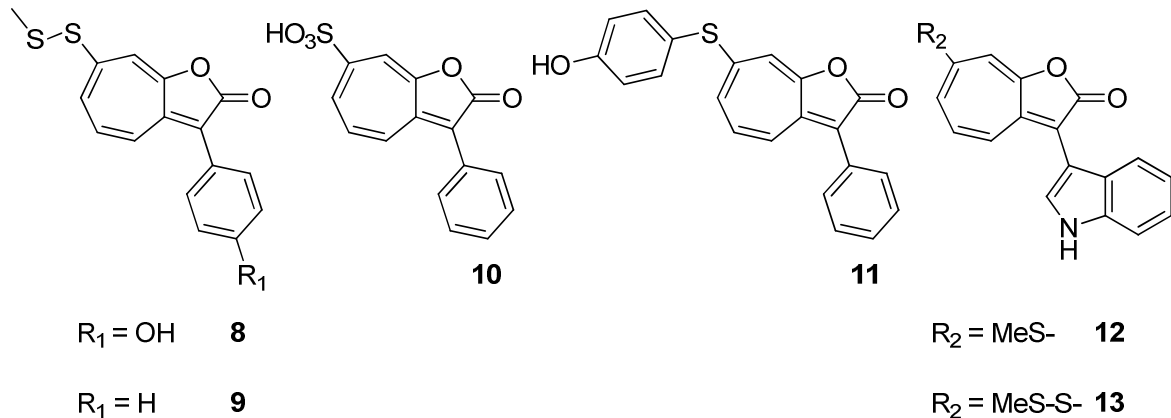


Abb. 4 Strukturen von Roseobakteriziden^[46]

Neben diesen Wirkstoffen ist eine weitere wichtige Gruppe von Sekundärmetaboliten identifiziert worden. Es handelt sich dabei um die Gruppe der *N*-Acylierten Homoserinlaktone, welche zur Kommunikation innerhalb der Bakterien wichtig sind.

1.2 Quorum Sensing

Kommunikation zwischen den einzelnen Mikroorganismen ist für den Erfolg in ihrer Umgebung sehr wichtig. Für die Kommunikation sind Moleküle verantwortlich, welche von den einzelnen Zellen an ihre Umgebung abgegeben werden. Basierend auf der Konzentration dieser Autoinducer wird eine Reaktion von den Bakterien ausgelöst. Wird also dieser Schwellenwert erreicht, reagiert das Bakterium nicht mehr als Einzeller, sondern agiert mit den umliegenden Zellen als multizellulärer Verband. Zu diesen Funktionen gehören unter anderem die Segregation von Virulenzfaktoren, Biofilmbildung, Antibiotika Produktion, Biolumineszenz, Sporenbildung und Konjugation.^{[47][48]}

Diese Zelldichteabhängige Kommunikation wird als „Quorum sensing“ bezeichnet.^[49] Dabei unterscheidet sich die Kommunikation, abhängig davon ob diese zwischen Gram-negativen oder Gram-positiven Bakterien stattfindet. Erstmals beschrieben wurde diese Form der Kommunikation bei dem Gram-positiven Bakterium *Streptococcus pneumoniae*.^[50] Wenige Jahre später folgte dann auch ein Beispiel der Zellkommunikation bei Gram-negativen Bakterien, dem marinen Bakterium *Vibrio fischeri*.^[51] Im Gegensatz zu der anfänglichen Annahme, dass es sich bei dieser Art der Kommunikation um eine Ausnahme handelt, sind mittlerweile viele weitere Beispiele bekannt, wie Mikroorganismen ihre benachbarten Zellen wahrnehmen und mit diesen kommunizieren können.

Die Quorum Sensing Systeme lassen sich in zwei grundsätzliche Klassen unterscheiden. Zum Einen in den LuxI/LuxR-Typ in Gram-negativen Bakterien und den Oligopeptide/Zwei-Komponenten-Typ in Gram-positiven Bakterien. Das Quorum Sensing System LuxS/AI-2 in *Vibrio harveyi*, einem Gram-negativen Bakterium, vereinigt sowohl Elemente aus dem LuxI/LuxR-Typ wie auch aus dem Oligopeptide/Zwei-Komponenten-Typ (Abb. 5).^[52]

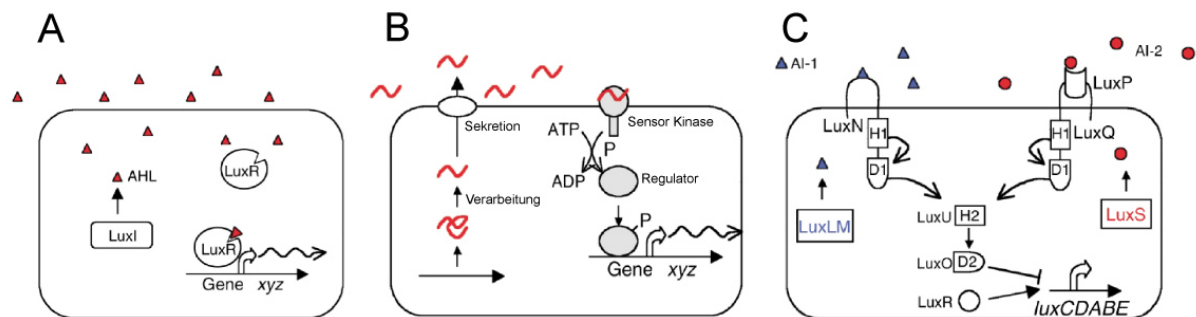


Abb. 5 Quorum Sensing Systeme bei Bakterien (A) LuxI/LuxR-Typ bei Gram-negativen Bakterien (B) AIP-Typ bei Gram-positiven Bakterien (C) LuxS/AI-2-Typ bei *Vibrio harveyi*.^[52]

In Gram-negativen Bakterien werden sogenannte *N*-Acylierte Homoserinlaktone (AHLs) als Signalmoleküle eingesetzt. Diese spezifischen AHLs werden unter anderem von den LuxI-Typ Proteinen produziert und sind in der Lage frei in und aus der Zelle zu diffundieren.^[53] Dabei

kann es sich um ein Einzelnes aber auch um mehrere Autoinducer handeln, abhängig von der Anzahl vorhandener LuxI-Typ Proteine. Die Detektion dieser Moleküle erfolgt an dem LuxR Protein, welches nach erfolgter Bindung an ein AHL für die Transkription bestimmter Gene verantwortlich ist. Durch den Einsatz spezifischer Seitenketten wird sichergestellt, dass nur Mitglieder derselben Spezies sich untereinander wahrnehmen und kommunizieren können.^[49] LuxI-homologe Proteine verwenden alle den identischen Homoserinlaktongring, variieren aber bei der Länge und Oxidation der Seitenkette (Abb. 6).

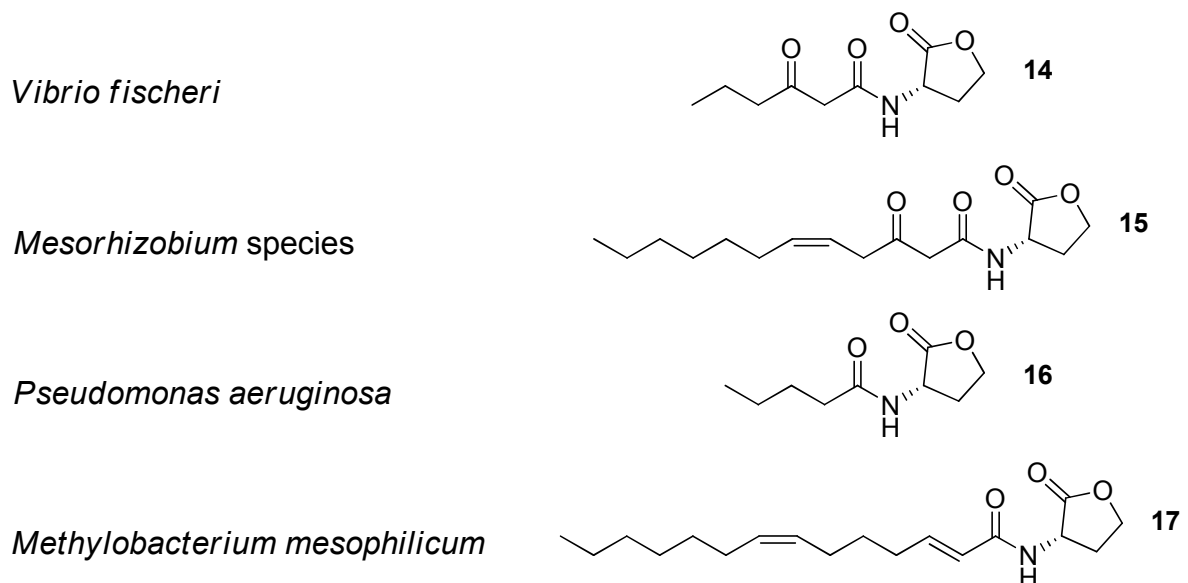


Abb. 6 Beispiele von Strukturen verschiedener AHL-Moleküle

Gram-positive Bakterien verwenden als Signalmoleküle statt AHLs Oligopeptide, sogenannte Autoinducer-Peptide (AIPs), welche meist aus 5-17 Aminosäuren mit Seitenkettenmodifikationen bestehen (Abb.7).^[54] Ähnlich wie bei den AHLs wird durch die Differenzierung in der spezifischen Abfolge von Aminosäuren ein hoch selektives Signalmolekül erhalten, welches ausschließlich von der spezifischen Spezies erkannt werden kann. Im Gegensatz zu den AHLs ist die Zellmembran für AIPs nicht permeable, so dass spezifische ATP-gesteuerte Oligopeptid-Transporter notwendig sind. Die Detektion erfolgt anschließend an einem Zwei-Komponenten Sensor-Transduktions-System, welches zu einer Phosphorylierung am Antwortregulator und zu der anschließenden Transkription der Zielgene führt.^[52]

Staphylococcus aureus

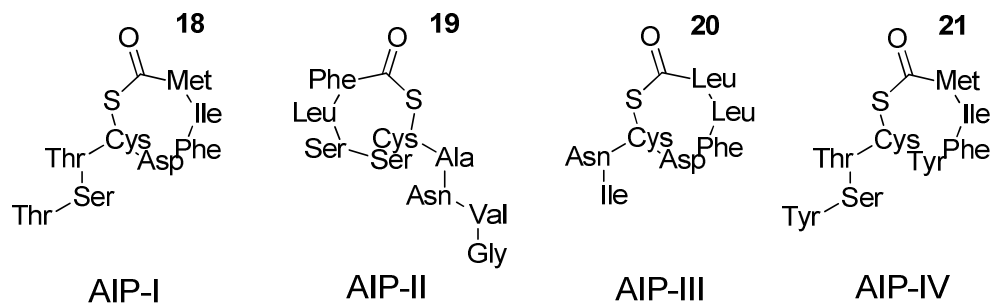


Abb. 7 Beispiele von Strukturen verschiedener AIP-Moleküle

Das dritte Quorum Sensing System ist der LuxS/AI-2-Typ am Beispiel von *Vibrio harveyi*. Diese Form der Kommunikation wird sowohl von Gram-negativen wie auch Gram-positiven Bakterien verwendet. Bei diesem System erfolgt die Kommunikation der Bakterien über die zwei Signalmoleküle AI-1 und AI-2. Der AHL-Typ Autoinducer AI-1 wird von dem Protein LuxLM produziert, zeigt aber keine Homologien mit der LuxI Familie, obwohl es die gleichen Funktionen wie die LuxI Enzyme übernimmt. Die Detektion erfolgt hier aber über ein Zwei-Komponenten System des LuxN Proteins. Das zweite Signalmolekül AI-2 wird von dem LuxS Enzym produziert. Dabei handelt es sich um ein Furanosyl-Borat-Diester **22** (Abb. 8). In diesem Fall sind für die Detektion dieses Autoinducers zwei Proteine verantwortlich. Zuerst bindet das AI-2 Molekül an das LuxP Protein. Dieser LuxP-AI-2 Komplex interagiert anschließend mit dem LuxQ Protein. Dieses Zwei-Komponenten Signal-Transduktions-System funktioniert ähnlich wie das LuxN Protein. Die Informationen von den LuxN und LuxPQ werden über das Phosphotransferase Protein LuxU an den Regulator LuxO weitergegeben. Die Dephosphorylierung von Phospho-LuxO durch Autoinducer gebundenes LuxN und LuxO ermöglicht nun durch LuxR die Transkription spezieller Gene.^[52]

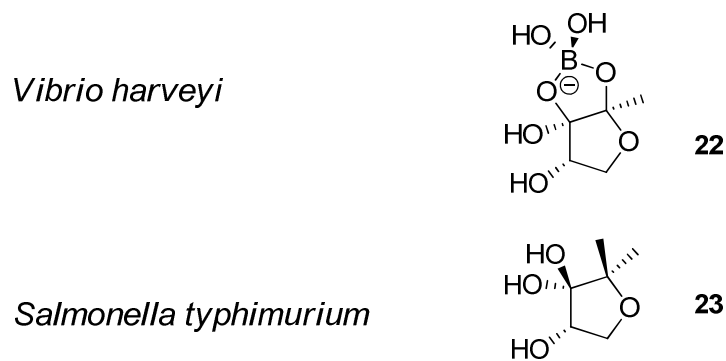


Abb. 8 Beispiele von Strukturen verschiedener AI-2 Moleküle

LuxS Gene wurden sowohl in Gram-negativen wie auch Gram-positiven Bakterien gefunden. Dabei besitzt das AI-2 Signalmolekül eine deutlich geringere Spezifität als die AHLs und AIPs, da die AI-2 Autoinducer von den meisten Bakterien, die dieses Quorum Sensing System benutzen, detektiert werden können. Somit scheint das AI-2 Molekül der interspezifischen Kommunikation zu dienen, wohingegen AHLs und AIPs eindeutig zur intraspezifischen Kommunikation verwendet werden.^[52]

1.3 N-Acylierte Homoserinlaktone

N-Acyl-Homoserinlaktone gehören zu den am Besten untersuchten bakteriellen Autoinducern. Die für die Produktion notwendigen LuxI Proteine wurden bereits in über 70 Gattungen der *Proteobacteria* gefunden.^[47] Neben den LuxI Proteinen sind die HdtS und LuxM Proteine ebenfalls dafür bekannt AHLs zu produzieren.^{[55][56]}

Da diese Signalmoleküle zur Kommunikation innerhalb einer bestimmten Art dienen, müssen diese sich durch Modifikationen in der Struktur von anderen Molekülen unterscheiden. Da alle AHLs die Homoserinlaktone Funktion als Gemeinsamkeit aufweisen, kann eben diese Differenzierung nur in der Seitenkette erfolgen. Der Aufbau von AHLs erfolgt dabei ausgehend von S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) und dem Acyl-Acyl Transport-Protein (Acyl-ACP) und wird durch die LuxI-Typ AHL Synthase katalysiert (Abb. 9).^{[57][58]}

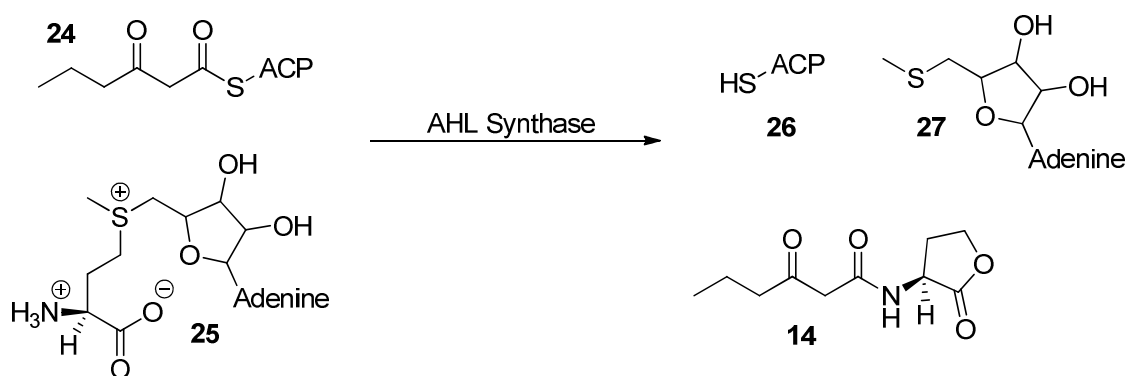


Abb. 9 Darstellung von 3-Oxo-C6-AHL **14** durch LuxI-Typ AHL Synthase^[56]

Bakterien können mehr als ein AHL Synthase Gen besitzen, wobei die Spezifität des Synthase Gens sehr hoch ist und somit meist nur ein spezielles AHL produziert wird. Es sind aber auch Synthasen beschrieben, welche mehrere Acyl-ACPs zulassen.^[59] Damit reicht das Spektrum an vorkommenden AHLs von einem einzigen Autoinducer bei *Pantoea stewartii* bis hin zu 24 im Falle von *Yersinia pseudotuberculosis*.^{[60][61]} Es gibt aber auch Gram-negative Bakterien wie *Echerichia coli*, welche keine AHL Synthase Gene besitzen, dafür aber in der Lage sind über Rezeptoren diese Signalmoleküle wahrzunehmen.^[62]

Die Variationen in der Seitenkette reichen von der unterschiedlichen Kettenlänge bis zu Oxidationen in verschiedenen Positionen. Bekannt sind AHLs mit einer Seitenkettenlänge von C4 bis C18.^[63] Zur weiteren Differenzierung treten unter anderem 3-Hydroxy- oder 3-Oxo-Substituenten aber auch Methylverzweigungen am Kettenende auf. Zusätzlich können Doppelbindungen in verschiedenen Positionen vorhanden sein, wobei die Lage sehr variabel ist. Bisher sind nur AHLs beschrieben, welche bis zu zwei Doppelbindungen enthalten.^[64]

Tabelle 1: Bekannte AHLs aus Roseobakterien^{[65][66]}

Bakterium	Stamm	AHL
<i>Phaeobacter inhibens</i>	DSM17395	3-OH-C10-AHL
<i>Ruegeria</i> sp.	KLH 11	3-OH-C14-AHL, 3-OH-C14:1-AHL, 3-OH-C12-AHL

Bakterium	Stamm	AHL
<i>Dinoroseobacter shibae</i>	DFL16	C8-AHL C18:2-AHL
	DFL27, DFL30, DFL 31	C18:1-AHL, C18:2-AHL
	DFL 36	C18:1-AHL
<i>Roseovarius muscosus</i>	DFL 35	C18:1-AHL
	DFL 24	C14:1-AHL, C18:1-AHL
<i>Roseovarius tolerans</i>	EL 52, EL 83, EL 172, EL 222	C14-AHL, C14:1-AHL
	EL 78, EL 90	C14-AHL, C14:1-AHL, 3-Oxo-C14:1-AHL
	EL 164	C14-AHL, C14:1-AHL, C16-AHL C16:1-AHL
	EL 171	C14-AHL, C14:1-AHL, C16-AHL
<i>Roseobacter litoralis</i>	DSM 7001	C8-AHL
<i>Staleyia guttiformis</i>	LM 09	C16-AHL, C16:1-AHL, C16:2-AHL
<i>Jannaschia helgolandensis</i>	HEL 10, HEL 26	C14:1-AHL, C16:1-AHL, C16:2-AHL
	HEL 43	C14:1-AHL, C16:2-AHL
<i>Oceanibulbus indolifex</i>	HEL 76	C16:1-AHL

Neben den bisher beschriebenen Fettsäure-Seitenketten scheint es aber auch Beispiele zu geben, bei denen die AHL Synthase andere Acyl-ACP akzeptiert. So ist von *Rhodopseudomonas palustris*, *Bradyrhizobium* sp. und *Silicibacter pomeroyi* bekannt, dass sie *p*-Coumaroyl-AHL **28** als Autoinducer verwenden (Abb. 10).^[67]

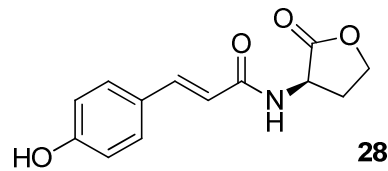


Abb. 10 Struktur von *p*-Coumaroyl-AHL **28**

Durch chemische oder enzymatische Reaktionen lassen sich diese Autoinducer leicht inaktivieren. So findet unter alkalischen Bedingungen sehr schnell eine Hydrolyse statt, wohingegen AHLs im pH Bereich von 5 bis 6 über Monate stabil sind.^[68] Dieser Umstand wird in der Natur von Pflanzen genutzt, um auf eine bakterielle Infektion zu reagieren.^[69] Durch Acylasen und Laktonasen lässt sich der enzymatische Abbau von AHLs ebenfalls leicht durchführen (Abb. 11). Die aus der Inaktivierung entstehenden Produkte werden dabei meist als Energiequelle oder als Nährstoff von verschiedenen Bakterien verwendet.^[70]

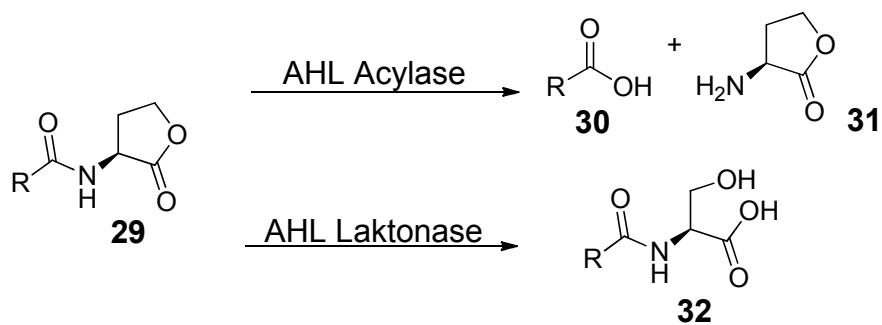


Abb. 11 Mechanismen zur Inaktivierung von AHLs

2. Themenstellung

Die Identifizierung bekannter wie auch unbekannter Metabolite aus verschiedenen marinen Bakterien stellte den Aufgabenschwerpunkt dieser Dissertation dar. Die zu der Gruppe der Roseobakterien zählenden Modellorganismen *Dinoroseobacter shibae* DFL12 und *Phaeobacter inhibens* DSM17395 standen dabei im Mittelpunkt. Die Bakterien und deren Mutanten wurden von der Arbeitsgruppe von PD Dr. T. Brinkhoff vom ICBM Oldenburg und von Prof. I. Wagner-Döbler vom HZI Braunschweig bereitgestellt.

Für den Nachweis der Metabolite sollten die Modellorganismen und Mutanten unter S1 Laborbedingungen kultiviert und extrahiert werden. Dabei sollte neben etablierten Verfahren, wie die Verwendung der CLSA zur Analyse von flüchtigen Verbindungen, auch andere Methoden verwendet beziehungsweise optimiert werden. Dazu zählt unter anderem die Verwendung des Adsorbens XAD-16 zur Anreicherung von Metaboliten aus der Kulturlösung an das Adsorberharz.

Die bereits in der Arbeitsgruppe etablierten Methoden der Analysen von Extrakten mittels GC/MS sollten zusätzlich durch die Verwendung von HPLC und HPLC/MS erweitert werden. So sollten die Naturproben nicht ausschließlich auf flüchtige Verbindungen hin untersucht werden, sondern auch das polare Spektrum der Metabolite erschlossen werden. Dafür sollten geeignete Methoden für die Chromatographie an verschiedenen geeigneten Phasen sowie die Wahl der optimalen Ionisation der Probe entwickelt werden. Zudem sollte der Zugang zu der Identifizierung von Metaboliten mittels HPLC/MS-MS zugänglich gemacht werden.

Neben der Analytik von Extrakten gehört auch die Verifikation der Verbindungen mit zu der Dissertation. So sollten zu potentiell interessanten Verbindungen Synthesen entwickelt und durchgeführt werden. Hierbei lag der Schwerpunkt vor allem auf die Bestätigung der postulierten Signalmoleküle aus *Dinoroseobacter shibae*.

3. Ergebnisse

3.1 *Dinoroseobacter shibae* DFL12

3.1.1 Allgemeines

Dinoroseobacter shibae DFL12 (Abb. 12) ist der Erste von zwei Modellorganismus die in dieser Arbeit beschrieben werden. Er gehört zu der Klasse der α -Proteobakterien. Erstmals isoliert wurde das Bakterium von *Prorocentrum lima*, einem Dinoflagellaten.^[71] In der Zwischenzeit sind aber auch Isolate mit anderen Wirtsorganismen bekannt, wie zum Beispiel die Dinoflagellaten *Alexandrium ostenfeldii*, *Prorocentrum reticulatum* oder *Isochrysis galbana*.^[72] Bis auf die letzte genannte Alge sind alle toxisch. *Dinoroseobacter shibae* kommt somit auf toxischen und nichttoxischen Algen vor.

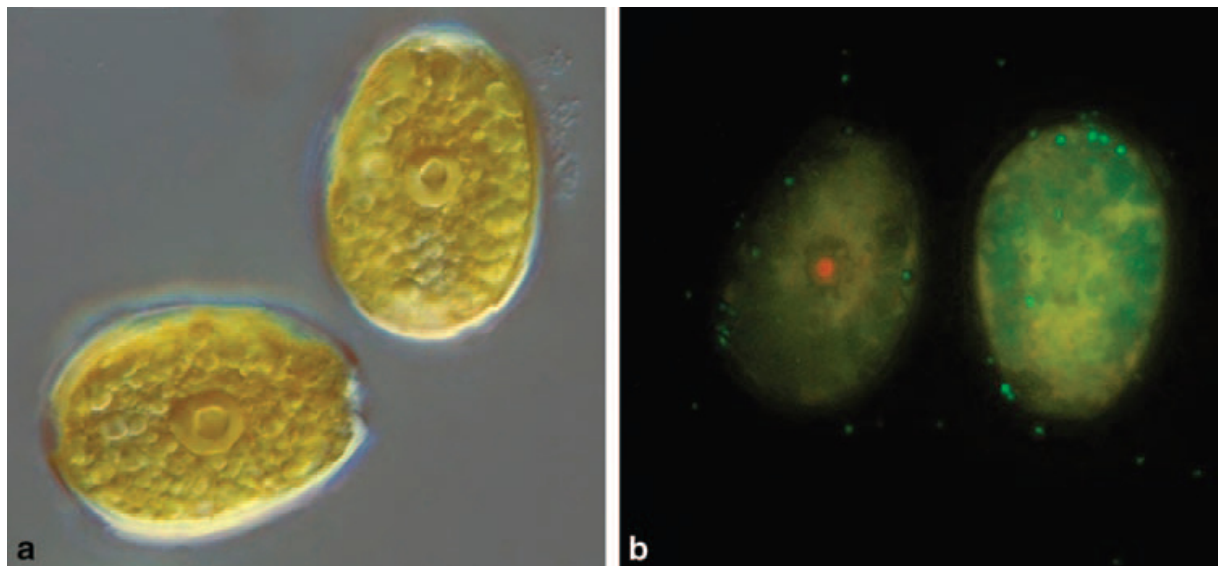
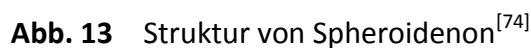


Abb. 12 (a) *Prorocentrum lima* mit *Dinoroseobacter shibae* (b) grün fluoreszierende Punkte stellen Zellen von *Dinoroseobacter shibae* auf der Oberfläche von *Prorocentrum lima* dar^[72]



- 16 -

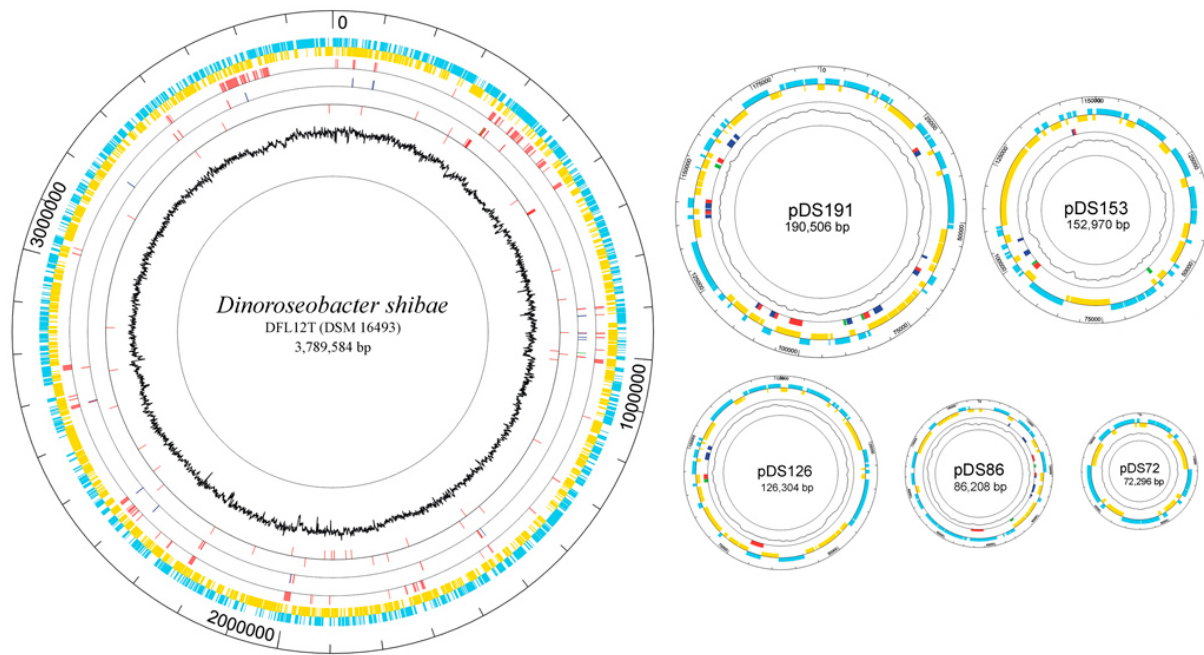


Abb. 14 Zyklische Darstellung des Kerngenoms und der Plasmide von *D. shibae* DFL12^[72]

3.1.2 Signalmoleküle

Bisherige Arbeiten zur Identifizierung von Signalmolekülen aus *Dinoroseobacter shibae* wurden bereits in der Arbeitsgruppe von SCHULZ *et al* und WAGNER-DÖBLER *et al* durchgeführt. Dabei wurden mehrere Stämme wie der DFL12, DFL16, DFL27, DFL30, DFL31, DFL36 und DFL38 per GC/MS sowie mittels zweier Biosensorstämmen analysiert. Als Reporterstämmen wurden *Pseudomonas putida* F117 (pRK-C12) zur Detektion von langkettigen AHLs sowie *Escherichia coli* MT102 (pJBA132) zur Detektion von kurzkettigen AHLs verwendet. Alle oben genannten *Dinoroseobacter* Isolate wurden dabei positiv auf AHLs getestet.^[72] Mit Ausnahme von DFL12 und DFL38 wurden per GC/MS fast ausschließlich langkettige AHLs gefunden. Dabei handelt es sich um C18:1-AHL **34** und C18:2-AHL **35**. Die Position der Doppelbindung war bisher aber nicht bestimmt worden. Als Besonderheit unter den *Dinoroseobacter shibae* Stämmen produzierte der Stamm DFL 16 zusätzlich ein C8-AHL **36**. Bei dem Stamm DFL12 und DFL38 konnten keine AHLs mittels GC/MS identifiziert werden.^[66]

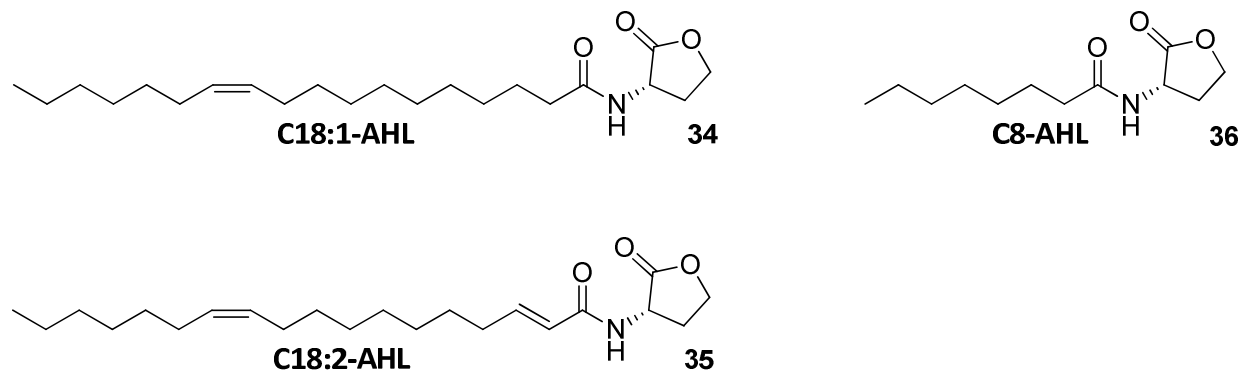


Abb. 15 Postulierte AHLs von *Dinoroseobacter shibae* DFL12: (Z)-N-Octadeca-11-enoyl-L-homoserinlaktone (**34**), (2E,11Z)-N-Octadeca-2,11-dienoyl-L-homoserinlaktone (**35**) und N-Octanoyl-L-homoserinlaktone (**36**)

Basierend auf den drei gefundenen *luxI*-Genen wurde angenommen, dass es sich bei diesen Genprodukten um C8-AHL **36**, C18:1-AHL **34** sowie C18:2-AHL **35** handeln sollte (Abb. 15). Eine Verifizierung dieser Annahmen mittels GC/MS Analyse war zunächst nicht erfolgreich, da das Bakterium die Signalmoleküle nur in sehr geringen Mengen produziert, welche unterhalb des Detektionsniveaus der analytischen Geräte liegt.

3.1.3 Expression der *luxI*-Gene in *Echerichia coli*

Die Identifizierung der unbekannten AHLs in *D. shibae* erwies sich aufgrund der geringen produzierten Menge als schwierig. Daher sollte ein anderer Ansatz verfolgt werden. *Echerichia coli*, ein gut untersuchtes Bakterium, welches nachweisbar keine Gene für die Synthese von AHLs besitzt, sollte durch Implementierung der Autoinducersynthasen aus *Dinoroseobacter shibae* in der Lage sein AHLs zu produzieren.^[75] Es stellte sich auch die Frage, ob es einen Unterschied zwischen den *luxI1*- und *luxI2*-Genen im Kerngenom und dem *luxI3*-Gen auf dem Plasmid gibt und welches dieser *luxI*-Genen für die Synthese welcher spezifischen AHL letztlich verantwortlich ist. Bei den nachfolgend als comp Mutanten bezeichneten Bakterien handelt es sich um eine Insertation des jeweiligen *luxI*-Genes aus *Dinoroseobacter shibae* DFL 12 in *Echerichia coli*, d.h. das die *E. coli* comp1 Mutante zusätzlich die *luxI1*-Gene von *D. shibae* im Genom enthält. Es bindet sich im Genom der

E. coli Mutanten ausschließlich ein einziges *luxI*-Gen. Diese Arbeiten wurden in der Arbeitsgruppe WAGNER-DÖBLER durchgeführt.

Die Analyse der GC/MS Chromatogramme der *E. coli* comp1 Mutante (Abb. 16) ergab eine Vielzahl von verschiedenlangen AHLs, allerdings fast keine, welche bereits aus *Dinoroseobacter shibae* Wildtyp bekannt waren oder im Rahmen dieser Arbeit identifiziert wurden. So zeigte diese Mutante ein Spektrum von AHLs mit Kettenlängen von C14 bis C18 mit Ausnahme von C17-AHL, wobei es sich bei C18-AHL um das einzige bisher aus *Dinoroseobacter shibae* beschriebene C18:1-AHL handelt. Alle anderen AHLs weisen dagegen eine vollständig gesättigte Seitenkette auf, obwohl der DFL12 Wildtyp kein AHL mit gesättigter Seitenkette produziert.

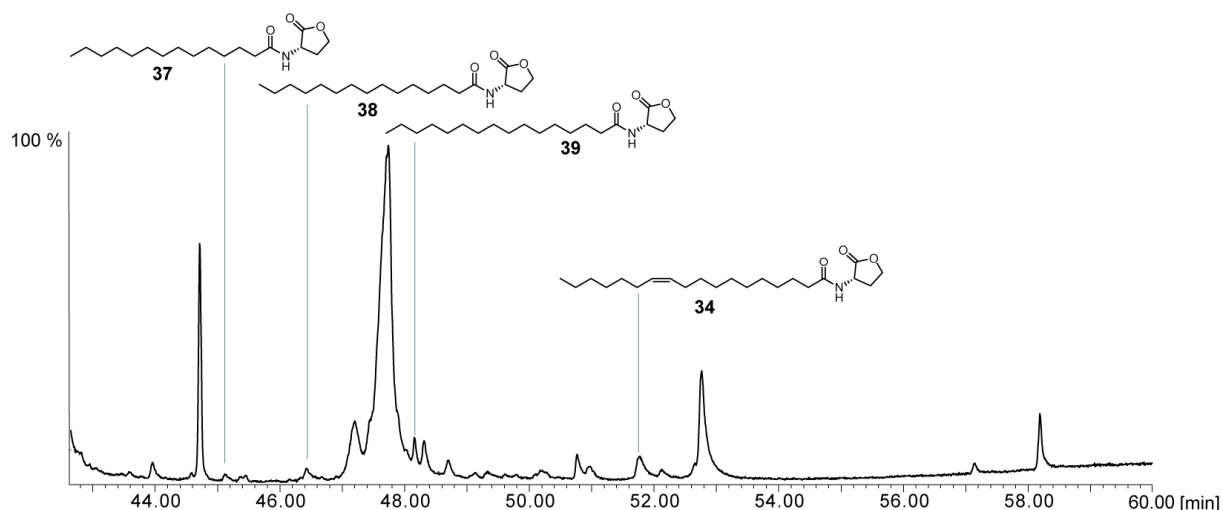


Abb. 16 Totalionenstrom-Chromatogramm der *E. coli* comp1 Mutante, identifizierte AHLs sind C14-AHL **37**, C15-AHL **38**, C16-AHL **39** und C18:1-AHL **34**

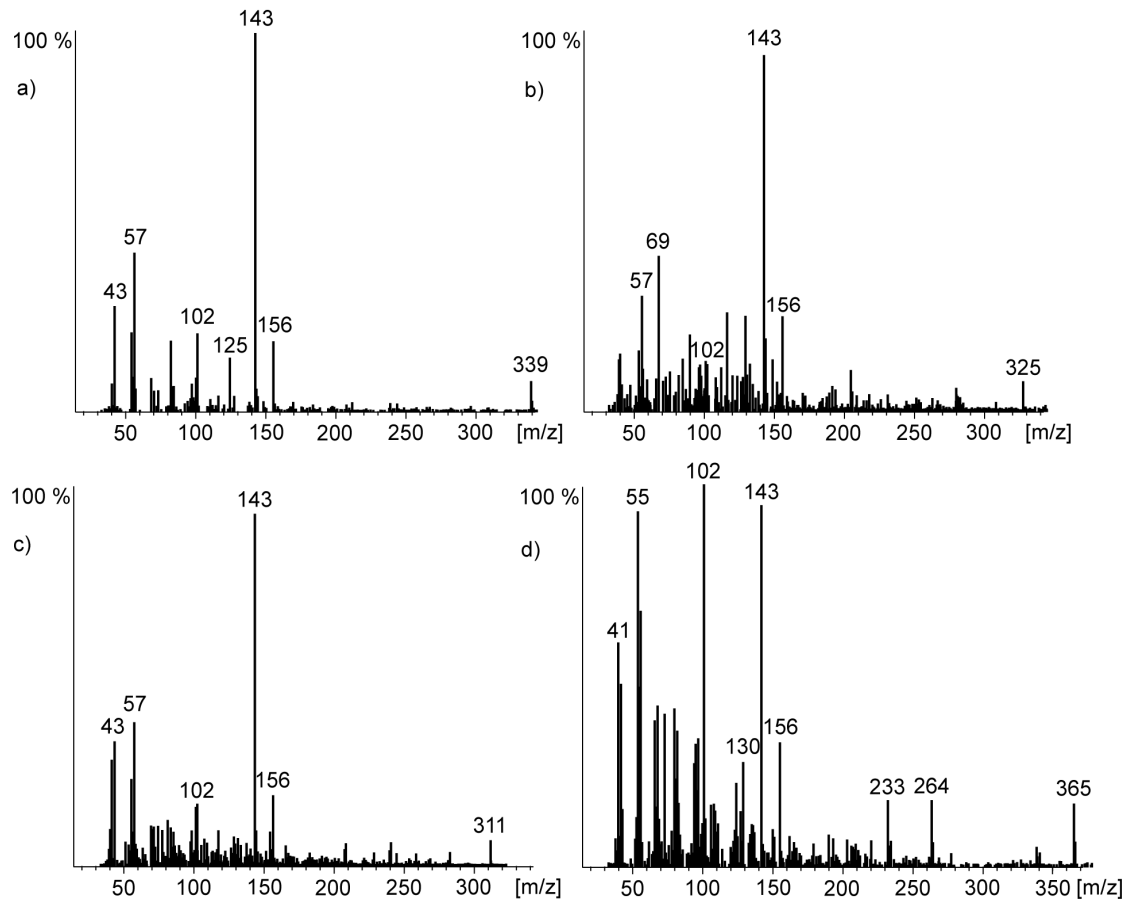


Abb. 17 Massenspektren der vier aus *E. coli* comp1 identifizierten AHLs a) C16-AHL **39** b) C15-AHL **38** c) C14-AHL **37** d) C18:1-AHL **34**

Die Identifizierung der Signalmoleküle aus der *E. coli* comp1 Mutante erfolgte anhand der charakteristischen Fragmentierungen in den EI-Massenspektren (Abb. 17). Dabei zeigen alle vier Massenspektren die Fragment-Ionen $m/z = 102$, $m/z = 143$ und $m/z = 156$. Zusätzlich sind die Molekularionen der Signalmoleküle mit $m/z = 339$ für C16-AHL, $m/z = 325$ für C15-AHL, $m/z = 311$ für C14-AHL und $m/z = 365$ für C18:1-AHL deutlich zuerkennen.

Die *E. coli* comp2 Mutante, welche zusätzlich das *luxI2* Gen im Genom enthält, zeigte im Gegensatz zur *E. coli* comp1 Mutante eine Mischung aus sowohl gesättigten wie auch ungesättigten AHLs, sowie einem AHL mit einer zusätzlichen Hydroxygruppe in 3-Position (Abb. 18). Dabei variieren die Kettenlängen zwischen C14 und C15. Somit ist in der

E. coli comp2 Mutante kein AHL beschrieben oder identifiziert worden, welches bereits im *Dinoroseobacter shibae* Wildtyp detektiert wurde.

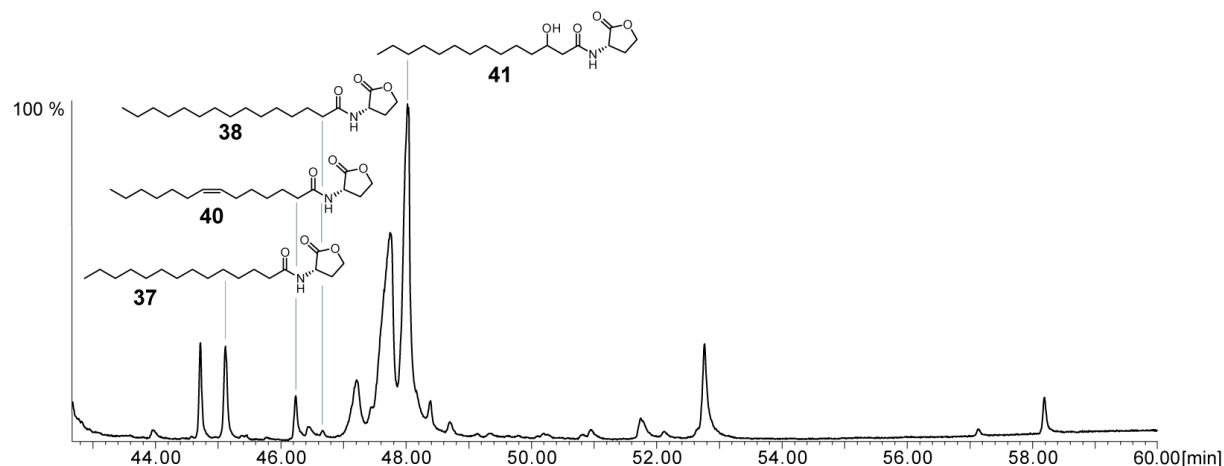


Abb. 18 Totalionenstrom-Chromatogramm der *E.coli* comp2 Mutante, identifizierte AHLs sind C14-AHL **37**, C14:1-AHL **40**, C15-AHL **38** und 3-OH-C14-AHL **41**

Die Identifizierung der Verbindungen aus der *Echerichia coli* comp2 Mutante erfolgte anhand der charakteristischen Fragmentierungen in den EI-Massenspektren (Abb. 19). Dabei zeigen alle vier Massenspektren die Fragment-Ionen $m/z = 102$ und $m/z = 143$. Die beiden Signalmoleküle mit den gesättigten Seitenketten zeigen zudem das Fragment-Ion $m/z = 156$. Bei 3-Hydroxytetradecanoyl-homoserinlaktone (**41**) zeigt sich mit $m/z = 172$ die für diese Seitenkettenoxidation typische Fragmentierung. Einzig bei dem einfach ungesättigten C14:1-AHL **40** ist die Fragmentierung nicht ganz eindeutig, da das zu erwartende Fragment-Ion $m/z = 156$ nicht vorhanden ist. Zusätzlich sind die Molekularionen der Signalmoleküle mit $m/z = 339$ für C16-AHL, $m/z = 325$ für C15-AHL, $m/z = 311$ für C14-AHL und $m/z = 365$ für C18:1-AHL deutlich zuerkennen.

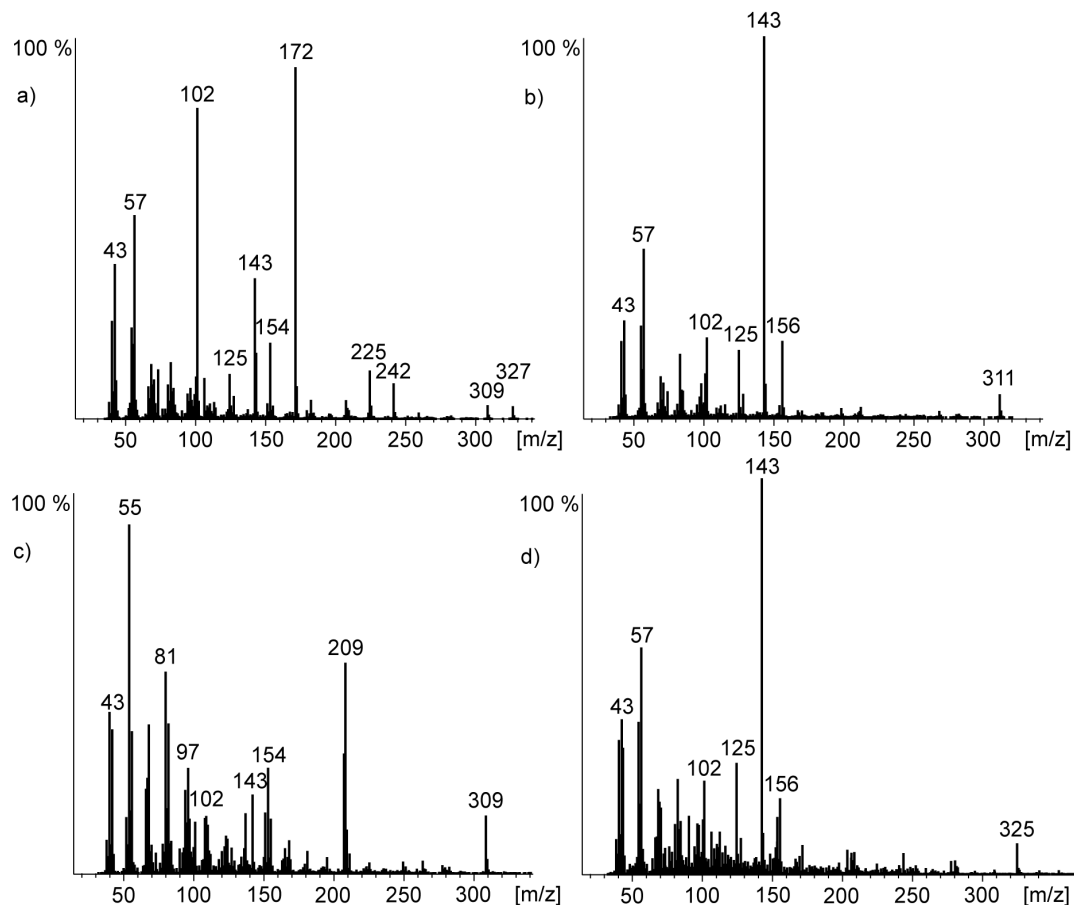


Abb. 19 Massenspektren der vier aus *E. coli* comp2 Mutante identifizierte AHLs a) 3-OH-C14-AHL b) C14-AHL c) C14:1-AHL d) C15-AHL

Im Gegensatz zu den anderen beiden *E. coli* comp1 und comp2 Mutanten zeigt die *E. coli* comp3 Mutante, welche das *luxI3*-Gene aus *D. shibae* DFL12 im Genom enthält, keine Produktion von AHLs (Abb. 20). Im gesamten für AHLs bekannten Retentionsbereich sind keine Übereinstimmungen zwischen den Massepeaks von $m/z = 102$ und $m/z = 143$ zu erkennen. Bei den beiden Peaks bei 51.7 min und 52.8 min handelt es sich um Metabolite von *Echerichia coli*, welche ebenfalls in den anderen Mutanten auftreten aber nicht die für AHLs typischen Fragmentierungen aufweisen.

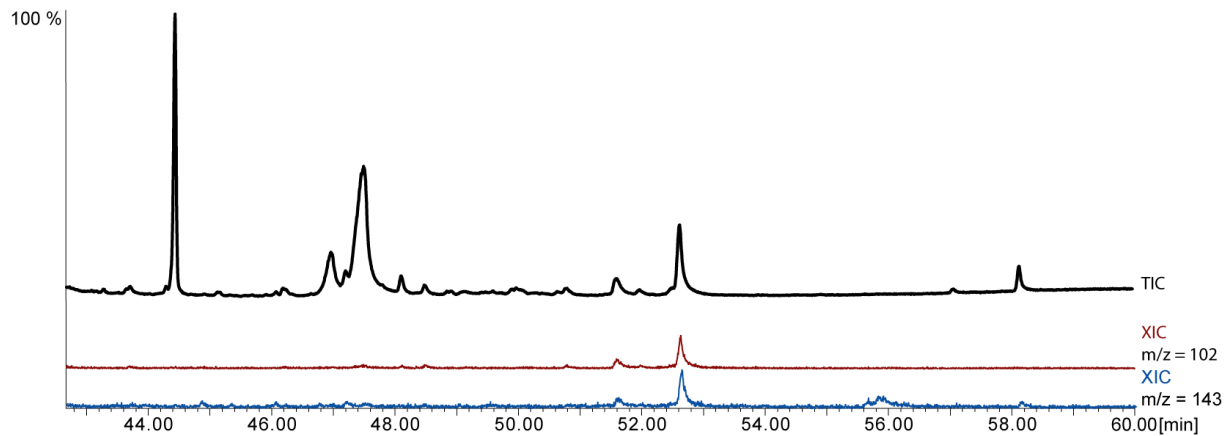


Abb. 20 Totalionenstrom-Chromatogramm von *E. coli* comp3 Mutante inklusive der Massenspur $m/z = 102$ und $m/z = 143$

Somit zeigen nur die *luxI*-Gene aus dem Zentralgenom von *D. shibae* in *Echerichia coli* eine Produktion von AHLs. Wobei es auch hier Unterschiede gibt. So scheinen die *luxI1*-Gene für langkettige AHLs und *luxI2*-Gene für kürzere AHLs verantwortlich zu sein. Zudem zeigt die comp2 Mutante einen höheren Grad an oxidierten Seitenketten der AHLs als die comp1 Mutante. Aufgrund der doch deutlichen Unterschiede zwischen den AHLs aus dem *Dinoroseobacter shibae* und der *Echerichia coli* Mutanten liegt der Schluss nahe, dass für die Synthese von AHLs nicht ausschließlich die *luxI*-Gene verantwortlich sind. Die Autoinducersynthesen sind offenbar recht tolerant in Bezug auf die Akzeptanz von verschiedenen Seitenkettenlängen und Oxidationen, da in jeweils anderen Bakterium andere Seitenkettenreste identifiziert wurden. Somit scheint die Fettsäuresynthese des Bakteriums eine ebenfalls wichtige Rolle bei der Produktion bestimmter AHLs zu spielen.

3.1.4 *luxI*-Mutanten von *Dinoroseobacter shibae*

Um die getroffene Annahme der in *Dinoroseobacter shibae* DFL12 vermuteten AHLs zu bestätigen, wurden die *luxI*-Gene überexprimiert nachdem die Synthesen vorher ausgeschaltet wurden. Bei der Analyse der Extrakte wurde analog zu den bisher analysierten *D. shibae* Stämmen das Absorber-Harz XAD-16 verwendet um eine zusätzliche Anreicherung der AHLs zu erreichen. Die Desorption erfolgte allerdings mit einem Dichlormethan/Wasser

Gemisch 10:1 statt mit Methanol. Dadurch konnten Parameter wie unter anderen das Signal-Rausch-Verhältnis in der GC/MS deutlich verbessert werden. Zusätzlich kann durch die Verwendung von DCM statt Methanol auch keine Lakton-Ringöffnung mehr stattfinden. Dies ist ein bekannter Abbauweg von AHLs, so dass sie in Methanolproben nach einiger Zeit nicht mehr nachgewiesen werden können.

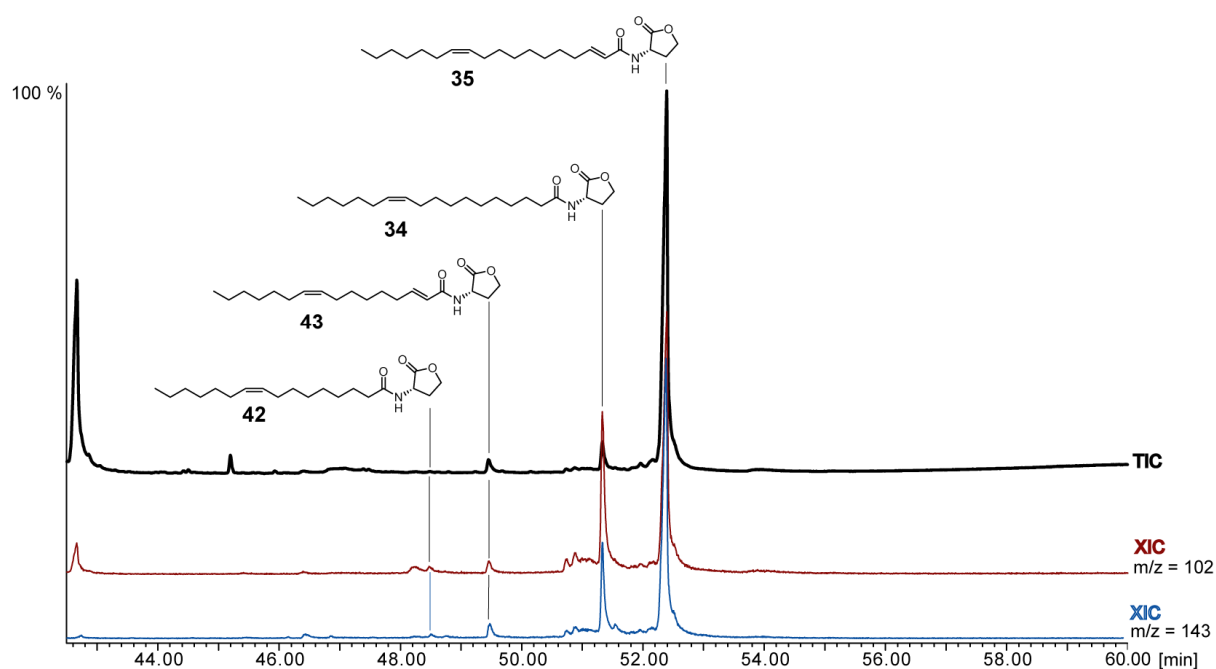


Abb. 21 Totalionenstrom-Chromatogramm von *luxI1* überexprimierten *Dinoroseobacter shibae* DFL12, charakteristische Ionenspektren $m/z = 102$ und $m/z = 143$ sind hervorgehoben, identifizierte AHLs sind C16:1-AHL **42**, C16:2-AHL **43**, C18:1-AHL **34** und C18:2-AHL **35**

Bei der Analyse der jeweiligen überexprimierten *luxI*-Mutanten konnte lediglich in der *luxI1*-Mutante ein signifikanter Anstieg der Konzentration an AHLs festgestellt werden. Das Chromatogramm (Abb. 21) dieses Extraktes zeigte deutlich einen Peak bei 52.4 min, welches anhand des Massenspektrum als C18:2-AHL identifiziert werden konnte. Als kleinere Komponente wurde C18:1-AHL gefunden. Beide AHLs sind bereits in früheren Arbeiten gefunden worden, die genaue Struktur wurde aber nicht bestimmt. Als Besonderheit tritt hier in sehr geringer Konzentration noch ein weiteres C18-AHL auf. Dieses besitzt basierend auf der gefundenen Masse von $m/z = 361$ insgesamt drei Unsatigungen in der Seitenkette.

Alle drei Massenspektren weisen die typischen Fragment-Ionen $m/z = 102$ und $m/z = 143$ auf. Bei dem α,β -gesättigten C18:1-AHL zeigt sich zudem noch das Fragment-Ion $m/z = 156$, welches bei den anderen beiden Verbindungen nicht zu beobachten ist. Zudem ist eine Abspaltung von der Masse 101 von der jeweiligen Molekülmasse zu beobachten, welche aus der Spaltung der Bindung zwischen Laktonring und Seitenkette herrührt. Die geringe Intensität des Fragmentes $m/z = 260$ im Massenspektrum des C18:3-AHLs rührt daher, dass sich die Elutionsprofile des C18:2-AHLs und des C18:3-AHLs überschneiden, das zweifach ungesättigte Signalmolekül aber den Base Peak im Chromatogramm darstellt. Daher ist eine Abbildung des reinen Massenspektrums dieser Verbindung ohne Anteile aus dem C18:2-AHL Massenspektrum nicht möglich und führt deshalb zur Darstellung von Fragment-Ionen, welche eindeutig dem C18:2-AHL zugeordnet werden kann. Dazu zählt das Fragment-Ion $m/z = 262$. Die Position der Doppelbindung wurde in dieser Arbeit bestätigt, mit Ausnahme von C18:3-AHL.

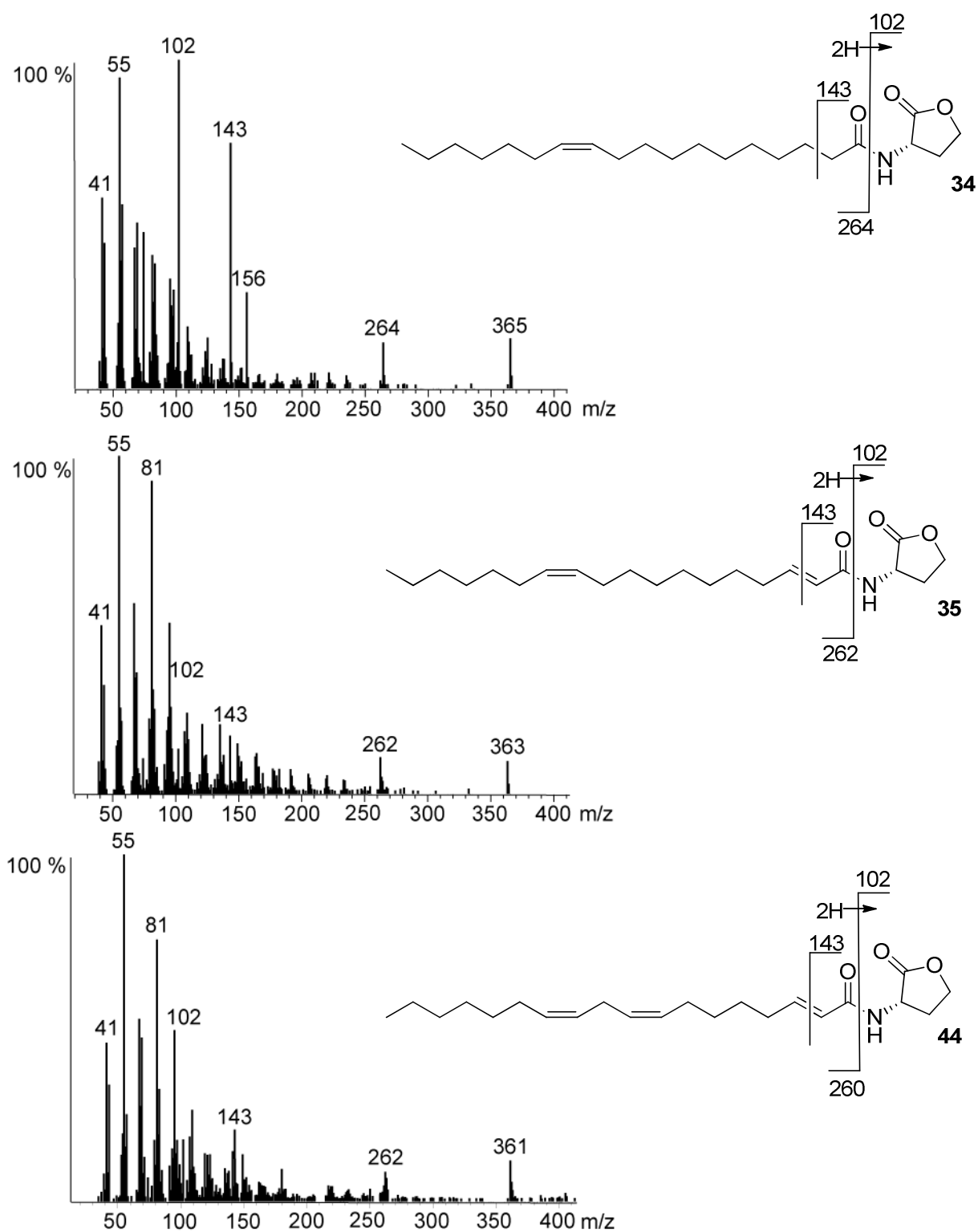


Abb. 22 Massenspektren aller identifizierten C18-AHLs aus der überexprimierten *Dinoroseobacter shibae* DFL12 Mutante (oben C18:1-AHL **34**, Mitte C18:2-AHL **35**, unten C18:3-AHL **44**)

Zusätzlich zu den bereits aufgeführten C18-AHLs sind die jeweils um zwei C-Atome kürzeren C16:2- und C16:1-AHLs enthalten (Abb. 23). Beide AHLs sind in früheren Arbeiten für *Dinoroseobacter shibae* DFL12 nicht postuliert worden, sind aber bereits aus anderen Roseobakterien bekannt.^[66] Während C16:1-AHL eine ähnliche Konzentration wie C18:2-AHL aufweist, ist das C16:2-AHL nur in geringer Konzentration nachzuweisen. Analog zu den C18AHLs weisen diese Signalmoleküle wieder die typischen Fragment-Ionen $m/z = 102$ und $m/z = 143$ auf. Zudem ist bei der einfach ungesättigten Verbindung das Fragment-Ion $m/z = 156$ zu erkennen. Auch der Verlust der Masse 101 von den jeweiligen Molekülmassen ist deutlich zu beobachten.

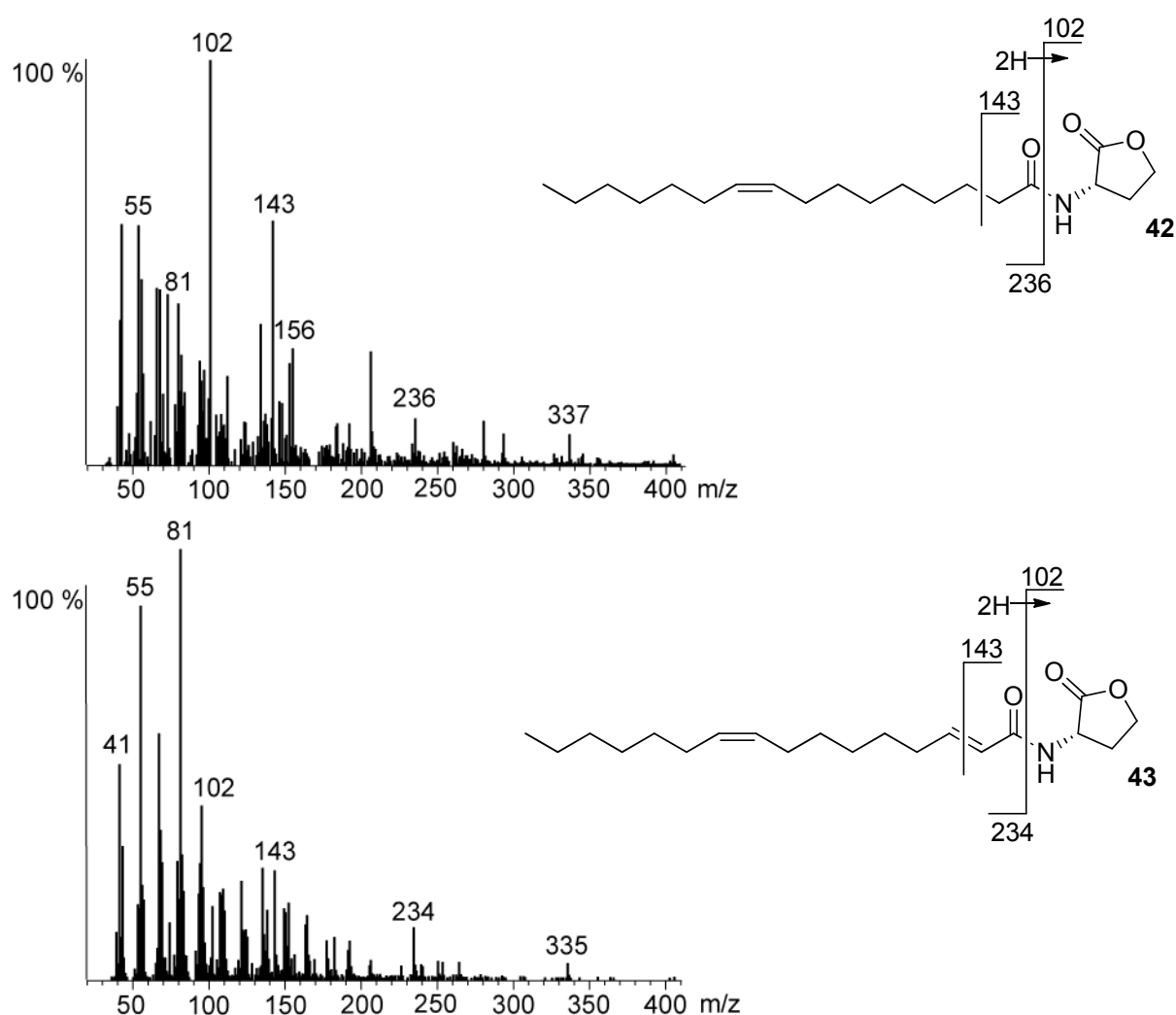


Abb. 23 Massenspektren aller identifizierten C16-AHLs aus der überexprimierten *Dinoroseobacter shibae luxI1* Mutante (oben C16:1AHL **42**, unten C16:2AHL **43**)

Neben den C18:1-AHL und C18:2-AHL wurde basierend auf der Anzahl der vorhandenen *luxI* Gene noch ein drittes AHL postuliert. Wie aus anderen *Dinoroseobacter shibae* Stämmen bekannt ist, ist dieses Bakterium in der Lage auch sehr kurzkettige AHLs zu synthetisieren. So wurde, basierend auf den positiven Bioassays für kurzkettige AHLs, auch das C8-AHL als mögliches Signalmolekül vorgeschlagen.^[72] Dieses konnte aber durch die Analysen nicht gefunden werden.

3.1.5 Vergleich AHLs im Voll- und Minimalmedium

Durch die Entwicklung der beschriebenen und optimierten Methode zur Anreicherung von AHLs an das Absorberharz XAD-16, konnten auch im *Dinoroseobacter shibae* DFL12 Wildtyp AHLs detektiert werden. Dabei wurde sich der bereits etablierten Methode des GC/MS bedient. Die Identifizierung erfolgte dabei wieder mit Hilfe der typischen Fragmente von $m/z = 102$ und $m/z = 143$. Problematisch bei dem Nachweis der Signalmoleküle sind vor allem die Medienbestandteile, allen voran die Klasse der Diketopiperazine. Diese weisen einen überlappenden Retentionsbereich auf und liefern teilweise identische Fragment-Ionen. Aufgrund der ansonsten aber verschiedenen Massenspektren und Molekülmassen lassen sich die Diketopiperazine von den AHLs unterscheiden. Problematisch wird es, wenn die Medienbestandteile die Signale der AHLs überlagern, da aufgrund des großen Unterschiedes in der Konzentration, die geringen Mengen der Signalmoleküle nur noch sehr schwer nachzuweisen sind. Daher wurde hier der Ansatz verfolgt, von dem bisher verwendeten Vollmedium, in diesem Fall marine broth medium, auf ein Minimalmedium, hier artificial seawater medium, zu wechseln. Der Vorteil der Verwendung einer anderen Kohlenstoffquelle ist das Ausbleiben der Diketoverbindungen und somit der Überlagerung. Allerdings sollte nun geklärt werden, in wie weit die Konzentration der schon im Vollmedium teilweise sehr gering vorkommenden AHLs im Minimalmedium noch weiter erniedrigt wird und somit eventuell wieder unter der Detektionsgrenze liegt.

Insgesamt konnten drei Signalmoleküle aus dem Vollmedium-Extrakt identifiziert werden (Abb. 24). Die Hauptkomponenten sind dabei das bereits beschriebene C18:2-AHL. Das ebenfalls für *Dinoroseobacter* Stämme bekannte C18:1-AHL konnte in mittlerer Konzentration nachgewiesen werden. In Spuren lässt sich auch das C16:2-AHL nachweisen, welches bereits in der *luxI1*-überexprimierten Mutante vom *Dinoroseobacter shibae* nachgewiesen wurde.

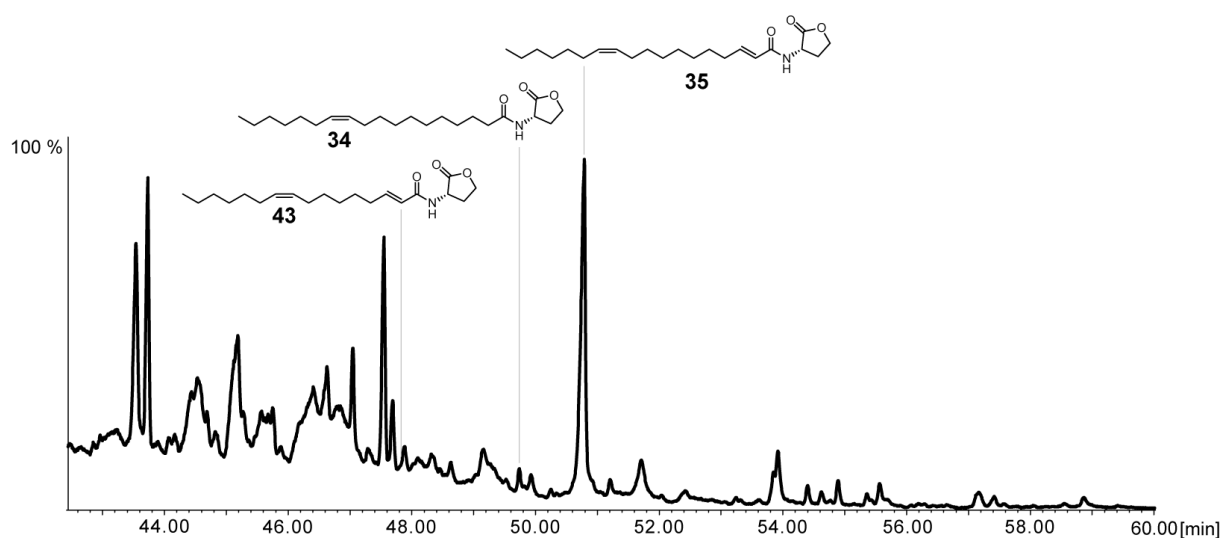


Abb. 24 Totalionenstrom-Chromatogramm von *Dinoroseobacter shibae* DFL12 Wildtyp in MB Medium, identifizierte AHLs sind C16:2-AHL **43**, C18:1-AHL **34** und C18:2-AHL **35**

Im Gegensatz zu dem Vollmedium ist im Minimalmedium die Konzentration um etwa Faktor 30 geringer. Nichtsdestotrotz lassen sich auch hier mittels GC/MS AHLs nachweisen. Analog zu dem MB Medium ist auch im SWM Medium C18:2-AHL das intensivste AHL. C18:1-AHL lässt sich allerdings nur noch in sehr geringen Konzentrationen nachweisen, während das im Vollmedium identifizierte C16:2-AHL im SWM Medium nicht nachzuweisen ist (Abb 25).

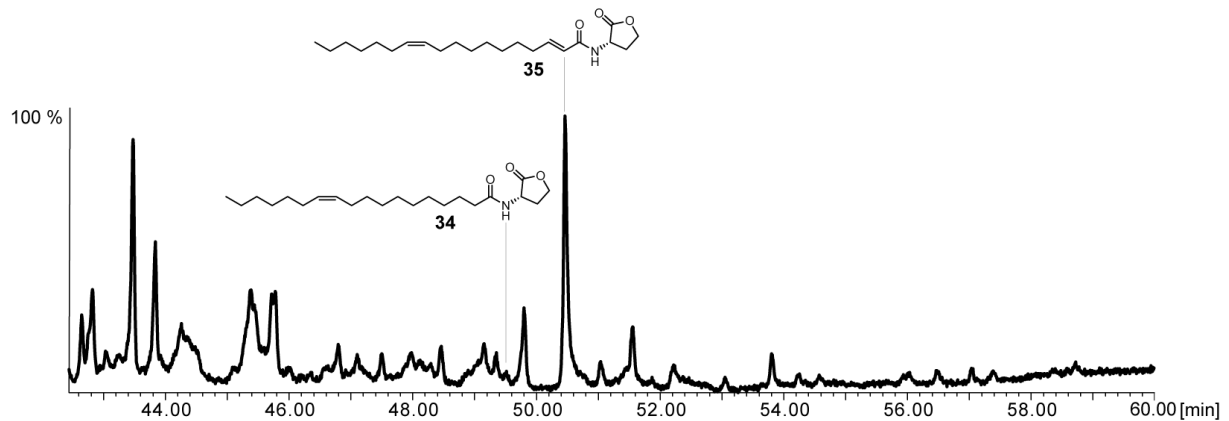


Abb. 25 Totalionenstrom-Chromatogramm von *Dinoroseobacter shibae* DFL12 Wildtyp in SWM Medium, identifizierte AHLs sind C18:1-AHL **34** und C18:2-AHL **35**

Dem Nachteil der doch deutlich geringen Intensität der AHL Peaks steht der Vorteil des völligen Fehlens von Medienbestandteilen gegenüber. So ist der Nachweis von eben diesen Signalmolekülen im Retentionsbereich von 20 bis 35 min nun problemlos möglich, wenn diese ausreichend, mittels Absorberharz, aufkonzentriert wurden. Über den gesamten Retentionsbereich hat sich zudem das Signal-Rausch-Verhältnis deutlich verbessert, so dass bei optimierten Wachstumsbedingungen auf dem Minimalmedium dieses bei der Analyse von Extrakten zu bevorzugen wäre.

3.1.6 $\Delta luxI$ -Mutanten von *Dinoroseobacter shibae*

Analog zu den *Escherichia coli* Mutanten wurden die Experimente mit *Dinoroseobacter shibae* wiederholt, da die comp Mutanten keine Rückschlüsse auf die Produktion spezifischer AHLs in *D. shibae* zuließen. Im Unterschied zu den *Escherichia coli* Mutanten wurde bei diesen Mutanten lediglich ein *luxI*-Gen ausgeknockt, so dass weiterhin zwei *luxI*-Gene aktiv sind. Aus den Ergebnissen lässt sich anschließend schlussfolgern welche *luxI*-Gene aktiv sind bzw. ob einzelne Gene essentiell für die Produktion von AHLs sind. Die Analyse erfolgte mit dem GC/MS. Basierend auf den Ergebnissen der vorangegangenen Mutanten ist zu erwarten, dass sowohl das C18:1-AHL wie auch das C18:2-AHL einzelnen bzw. bestimmten *luxI*-Genen zugeordnet werden kann.

Die erste untersuchte Mutante ist *D. shibae* $\Delta luxI1$, welche die beiden *luxI2* und *luxI3* Gene besitzt. Die Auswertung des Chromatogramms ergab im erwarteten Retentionsbereich keine erkennbaren AHLs (Abb. 26). Dies konnte anhand des Fehlens der charakteristischen Fragment-Ionen $m/z = 102$ und $m/z = 143$ verdeutlicht werden. Dies lässt den Schluss zu, dass das *luxI1* Gen essentiell für die Synthese von AHLs ist.

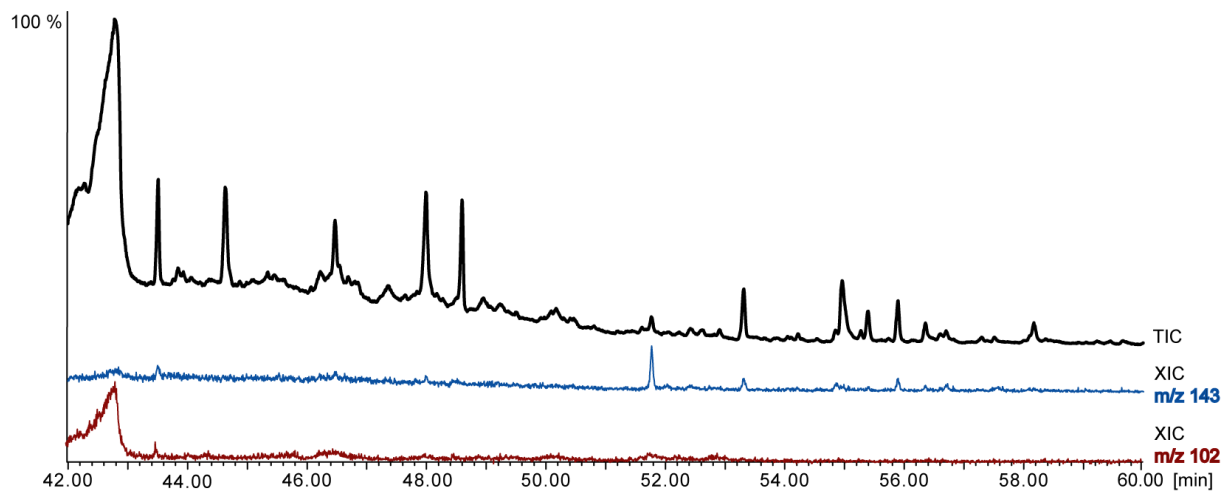


Abb. 26 Totalionenstrom-Chromatogramm der *Dinoroseobacter shibae* $\Delta luxI1$ Mutante

Bei der $\Delta luxI2$ Mutante ist entsprechend das *luxI2* Gen ausknockt, so dass sich im Genom nur noch die *luxI1* und *luxI3* Gene befinden. Interessanterweise zeigt sich hier im Chromatogramm eine deutliche Übereinstimmung der Peaks aus den Massespuren $m/z = 102$ und $m/z = 143$ (Abb. 27). Diese konnten anhand der Massespektren eindeutig dem C18:1-AHL und dem C18:2-AHL zugeordnet werden.

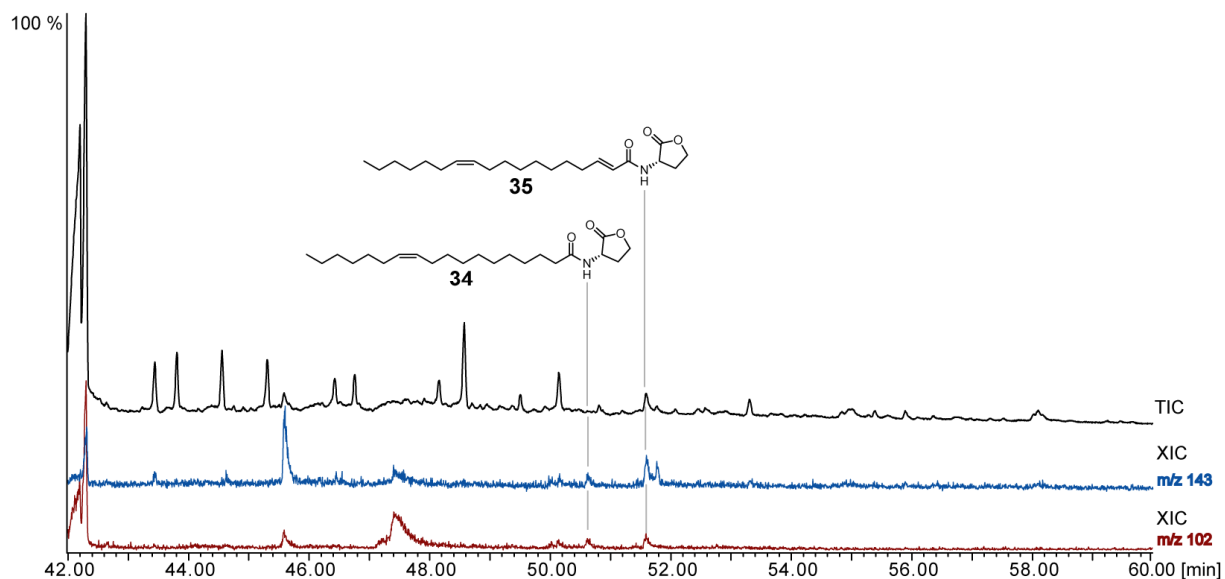


Abb. 27 Totalionenstrom-Chromatogramm der *Dinoroseobacter shibae* $\Delta luxI2$ Mutante, identifizierte AHLs sind C18:1-AHL **34** und C18:2-AHL **35**

Die *Dinoroseobacter shibae* $\Delta luxI3$ Mutante wurde analog zu den anderen Mutanten konstruiert, so dass diese nur noch die *luxI1* und *luxI2* Gene besitzt. Auch hier lassen sich im Chromatogramm die bereits bekannten langkettigen C18-AHLs anhand der Massespuren nachweisen (Abb. 28).

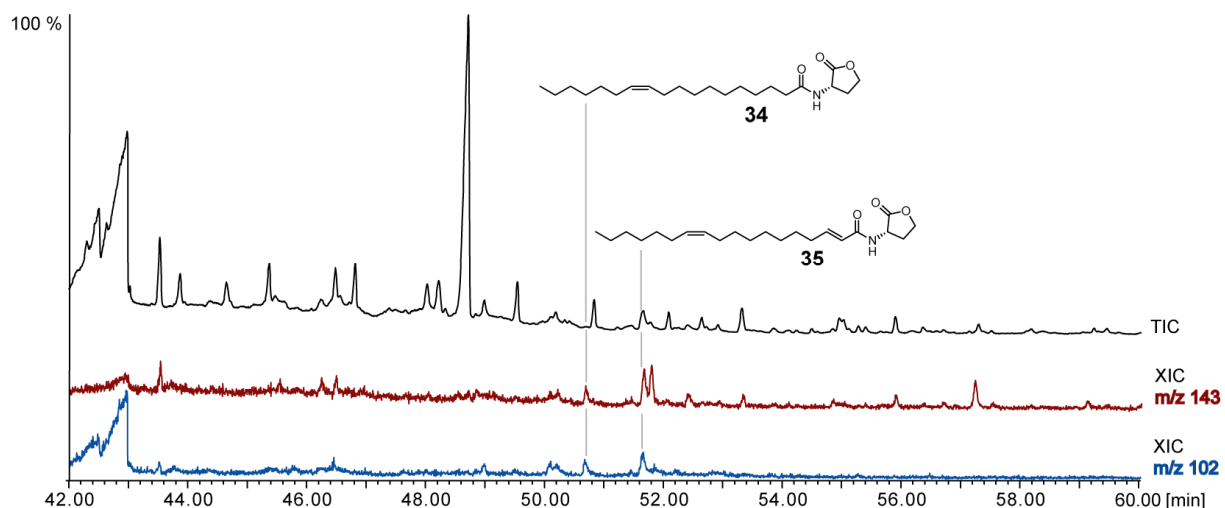


Abb. 28 Totalionenstrom-Chromatogramm der *Dinoroseobacter shibae* $\Delta luxI3$ Mutante, identifizierte AHLs sind C18:1-AHL **34** und C18:2-AHL **35**

Somit kann aus der Auswertung der Chromatogramme geschlossen werden, dass das *luxI1* Gen notwendig für die Synthese von AHLs ist. Ist dieses Gen ausgeknockt, konnten keine AHLs mittels GC/MS detektiert werden. Allerdings zeigte sich kein Unterschied, ob das *luxI2* oder das *luxI3* Gen zusammen mit dem *luxI1* Gen aktiv ist, da in beiden Fällen die gleichen AHLs nachgewiesen wurden. Ein drittes AHL konnte aufgrund der sehr geringen Konzentration der Signalmoleküle im Wildtyp nicht mehr nachgewiesen werden. Die beiden C18:1- und C18:2-AHLs werden durch das *luxI1* Gen kodiert. Welche AHLs durch die *luxI2* bzw. *luxI3* Gene kodiert werden bleibt auch weiterhin unbeantwortet. Das C16:2-AHL, welches auch in geringer Konzentration im Wildtyp gefunden wurde, konnte in keinem der Extrakte der Deletionsmutanten nachgewiesen werden.

3.1.7 Strukturaufklärung

Anhand der GC/MS Analysen der verschiedenen Extrakte konnten strukturelle Vorschläge für die nicht näher charakterisierten Verbindungen C18:1-AHL und C18:2-AHL erarbeitet werden. Dabei wurden vor allem die EI-Massenspektren herangezogen. So lassen sich aus dem Spektrum neben der Molekülmasse auch Aussagen über den Aufbau des Moleküles selbst machen.

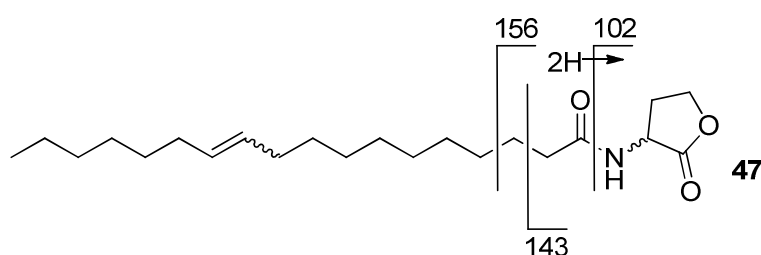


Abb. 29 Fragmentierungsschema von einfach ungesättigten C18AHL

Grundsätzlich zeigen AHLs zwei charakteristische Fragment-Ionen (Abb. 29). Das Fragment mit $m/z = 102$ lässt sich auf die Spaltung der Amid-Bindung zurückführen und repräsentiert mit der Summenformel $C_4H_8NO_2^+$ den Homoserinlaktone. Dabei werden vom Rest des

Moleküles zwei H-Atome übertragen.^[48] Das Fragment $m/z = 143$ mit der chemischen Zusammensetzung von $C_6H_9NO_3^+$ bildet sich dagegen durch eine McLafferty Umlagerung. Weitere charakteristische Fragment-Ionen verweisen auf eventuelle Oxidationen in der Seitenkette. Ist an der Position 3 keine Oxidation vorhanden, so zeigt sich im EI-Spektrum das Fragment $m/z = 156$. Diese Fragmentierung ist allerdings häufig sehr schwach. Besonders auffällig ist dabei das Fragment $m/z = 264$ im Falle des C18:1-AHLs bzw. $m/z = 262$ im Fall des C18:2-AHLs, welches das verbliebene Seitenkettenfragment ohne die Homoserinlacton-Ring Gruppe darstellt. Diese Fragmentierung ist vor allem bei langkettigen AHLs sehr gut zu beobachten.

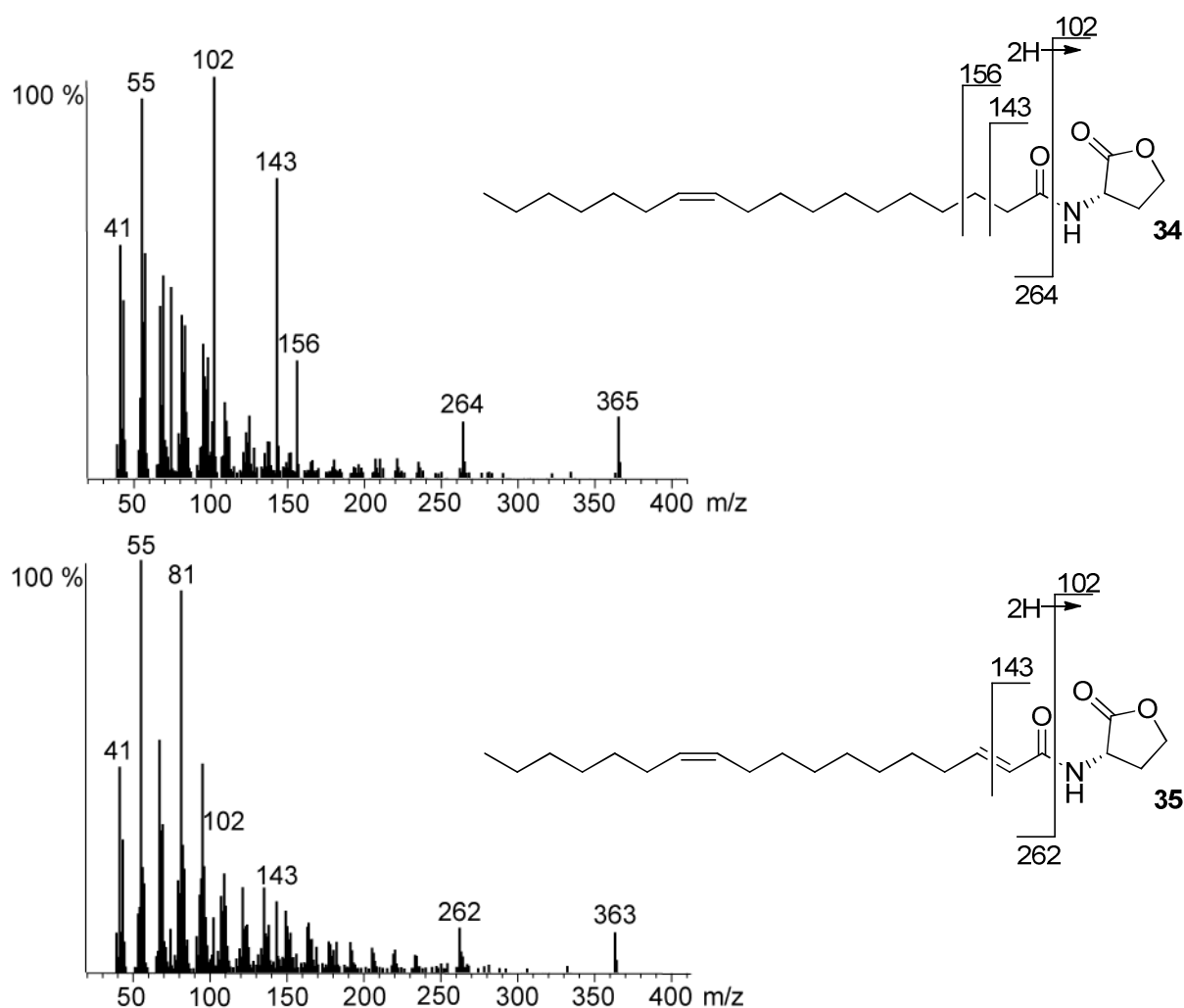


Abb. 30 Massenspektren von C18:1AHL **34** und C18:2AHL **35**

Allerdings lassen sich anhand der EI-MS-Spektren keine Aussagen über die Lage der Doppelbindungen machen. Lediglich die Angabe über die Anzahl der Unsättigungen in der Seitenkette ist möglich. So konnte basierend von der Masse C18-AHLs mit einer Molekülmasse von 367 g/mol neben den bereits erwähnten C18:1-AHL mit 365 g/mol auch C18:2-AHL mit 363 g/mol nachgewiesen werden. Die Massenspektren sind in Abb. 30 dargestellt.

Um die Lage der Doppelbindung zu bestimmen wurde eine Iod-katalysierte Derivatisierung mit Dimethyldisulfid verwendet.^[76] Dieses Schwefelreagenz addiert an die Doppelbindung und bildet ein Bis(thiomethyl)-Derivat. Dabei ist anzumerken, dass α,β -ungesättigte Verbindungen aufgrund der geringeren Reaktivität, welche auf den Elektronenzug der Carbonyl-Gruppe zurückzuführen ist, nicht zur Reaktion mit DMDS gebracht werden können. Durch die charakteristische EI-MS-Fragmentierung, einer α -Spaltung zwischen den beiden Methylthio-Funktionen, lassen sich nun Aussagen über die Lage der Doppelbindung treffen (Abb. 31).^[77]

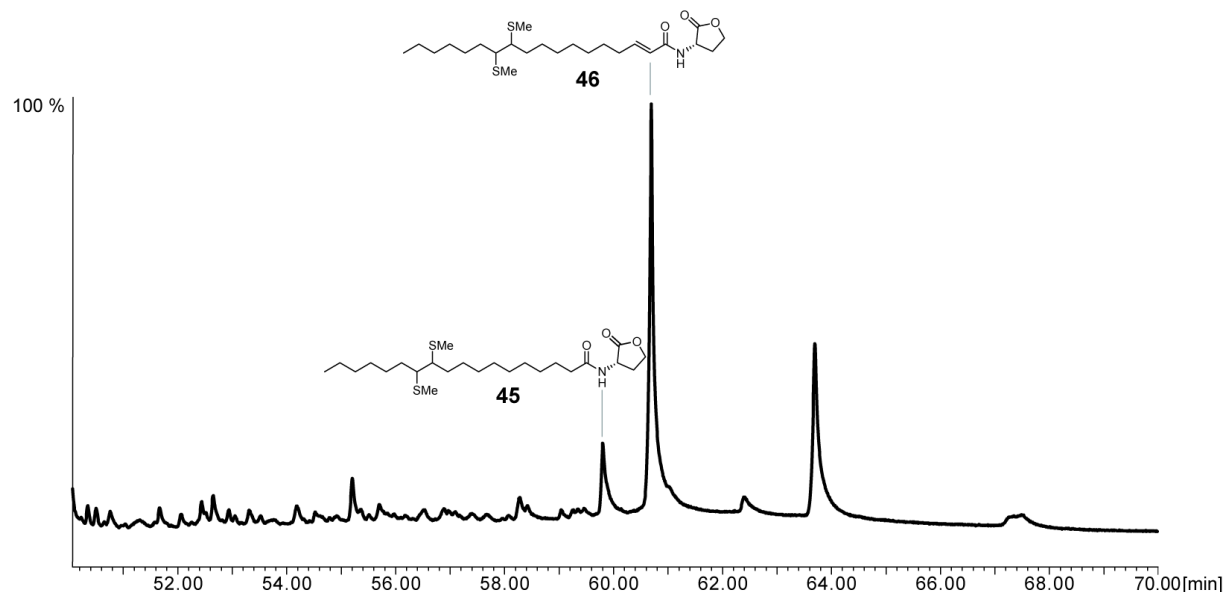


Abb. 31 Totalionenstrom-Chromatogramm der DMDS-derivatisierten AHLs **45** und **46** aus *luxI1*-überexprimierten *Dinoroseobacter shibae*

Wie bereits in der Literatur erwähnt, wird auch ausschließlich das Monoaddukt des DMDS an C18:2-AHL erhalten.^[78] Daraus lässt sich ableiten, dass sich die zweite Doppelbindung in α,β -Position befinden muss. Die Molekülmasse der DMDS-Derivate beträgt 459 g/mol (C18:1-AHL **45**) und 457 g/mol (C18:2-AHL **46**) (Abb. 32). Die charakteristischen Fragmente, welche eindeutig die Lage der Doppelbindung beschreiben, sind bei C18:1-AHL $m/z = 314$ und $m/z = 145$. Im Fall des zweifach ungesättigten AHL sind es $m/z = 312$ und $m/z = 145$. Auffällig ist, dass beide Massenspektren das Fragment $m/z = 145$ aufweisen, welches einem Fragment mit der Zusammensetzung $C_8H_{17}S^+$ entspricht. Damit lassen sich die Position der Doppelbindung auf (11)-C18:1-AHL und (2,11)-C18:2-AHL festlegen. Die intensivsten Fragmentierung in den Spektren, gebildet durch die Fragment-Ionen $m/z = 213$ und $m/z = 211$, resultieren aus der Bindungsspaltung zwischen Lakton und Seitenkette sowie der Spaltung zwischen den Methylthio-Gruppen. Aufgrund des sehr geringen Anteils von C18:3-AHL und der aus dem DMDS-Addukt resultierenden höheren Retentionszeit ist keine solche Verbindung im GC/MS-Chromatogramm aufzufinden.

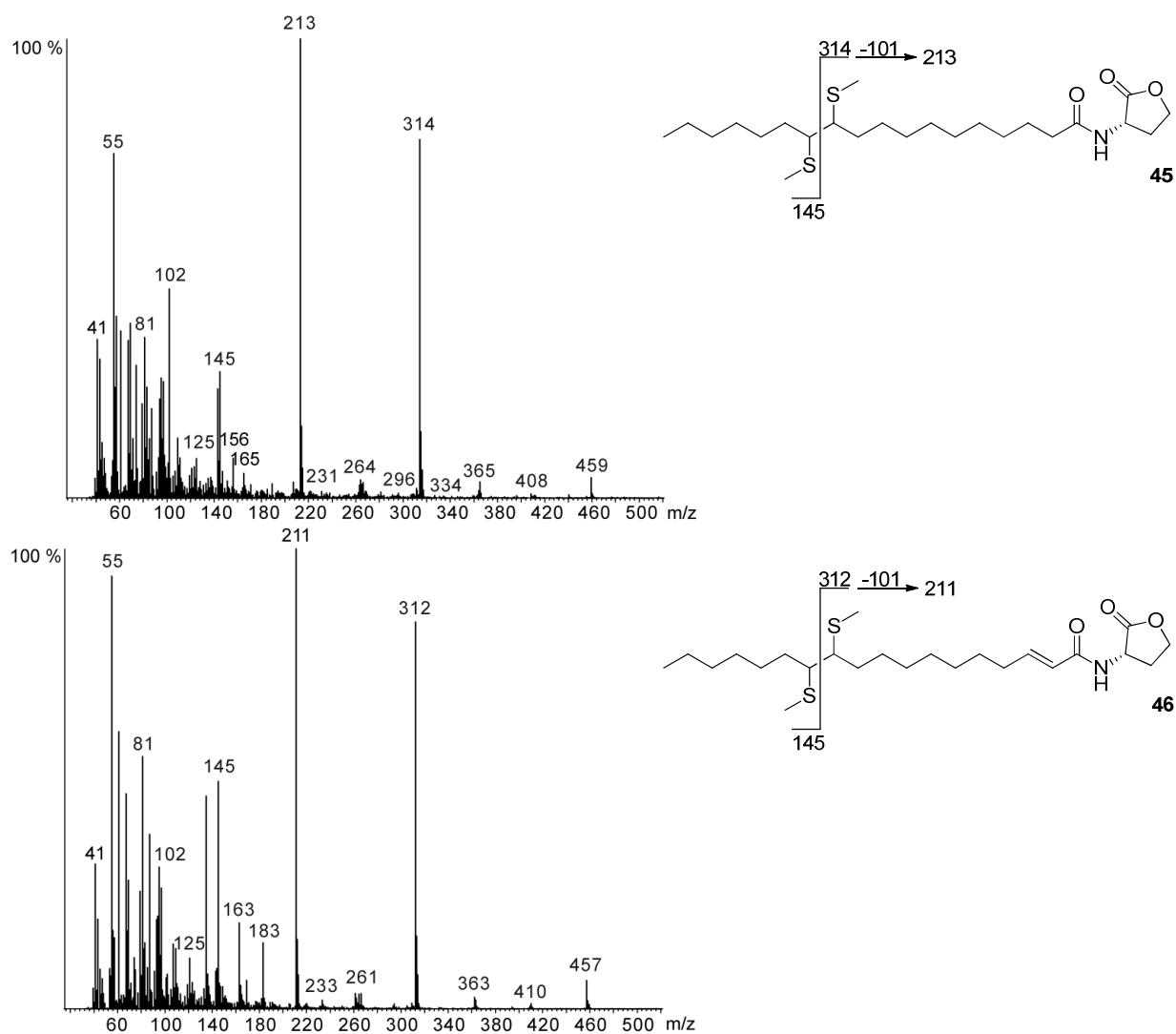


Abb. 32 Massenspektren der DMDS-derivatisierten C18:1-AHL **45** (oben) und C18:2-AHL **46** (unten)

Zwar lässt die Derivatisierung Aussagen zu der Lage der Doppelbindung zu, allerdings bleibt die Konfiguration der Doppelbindung weiterhin unklar. Prinzipiell ist davon auszugehen, dass es sich bei allen gefundenen ungesättigten AHLs um Z-konfigurierte Doppelbindungen handelt, da es in der bisher erschienenen Literatur keinen einzigen Nachweis eines *E*-konfigurierten AHLs gibt.^[48]

3.1.8 Synthese der Homoserinlaktone aus *Dinoroseobacter shibae* Wildtyp

Um die aus den Fragmentierungsmustern abgeleiteten Strukturen schlussendlich verifizieren zu können, bedarf es der Synthese der Verbindung mit anschließendem Vergleich der Fragmentierung und Retention. Aus dem *Dinoroseobacter shibae* DFL12 konnten insgesamt zwei langkettige Signalmoleküle, (11)-C18:1-AHL und (2,11)-C18:2-AHL, identifiziert werden. Die Konfiguration der Doppelbindung orientiert sich dabei an bereits gefundene ungesättigte Homoserinlaktone. So sind bereits die C16:1-AHL und C16:2-AHL beschrieben worden.^[64] Hierbei befindet sich die erste Doppelbindung in der Seitenkette, die zweite Unsättigung direkt in α -Position zum Amid. Bei der Synthese des C16:2-AHLs wurde außerdem gezeigt, dass es sich bei der in der Kette befindlichen Unsättigung um eine Z-konfigurierte Doppelbindung handelt, weswegen bei den folgenden Synthesen ebenfalls eine *cis*-Doppelbindung angenommen wurde. Die Doppelbindung in α -Position zu dem Amid wird dagegen als *trans*-konfiguriert angenommen, welches ebenfalls analog zu der Konfiguration des in α -Position befindlichen Doppelbindung im C16:2-AHL ist.

3.1.8.1 Erster Syntheseansatz von (2E,11Z)-(2,11-Octadecadienoyl)-L-homoserinlaktone

Die erste Synthese des (2E,11Z)-(2,11-Octadecadienoyl)-L-homoserinlaktone (**35**) wurde ausgehend von 1-Octin (**48**) und 7-Bromheptansäuremethylester (**49**) durchgeführt (Abb. 33). Schwerpunkt dieses Ansatzes ist der Aufbau der Z-Doppelbindung an 11-Position durch die Hydrierung eines Alkins mit dem Lindlar-Katalysator. Der Vorteil dabei ist die durch den Mechanismus bedingte hohe Selektivität, welche ausschließlich zu dem gewünschten Z-Produkt führt. Die Entschützung des primären Alkohols **52** und dessen Oxidation zu dem entsprechenden Aldehyd **53** ermöglicht nun den Zugang die fehlende E-Doppelbindung über eine Horner-Wadsworth-Emmons Reaktion aufzubauen. Der dabei erhaltene ungesättigte Ester **54** sollte anschließend verseift werden und mit Hilfe einer EDC vermittelten Reaktion schlussendlich mit dem Homoserinlaktone **55** zu dem gewünschten AHL **35** gekoppelt werden.

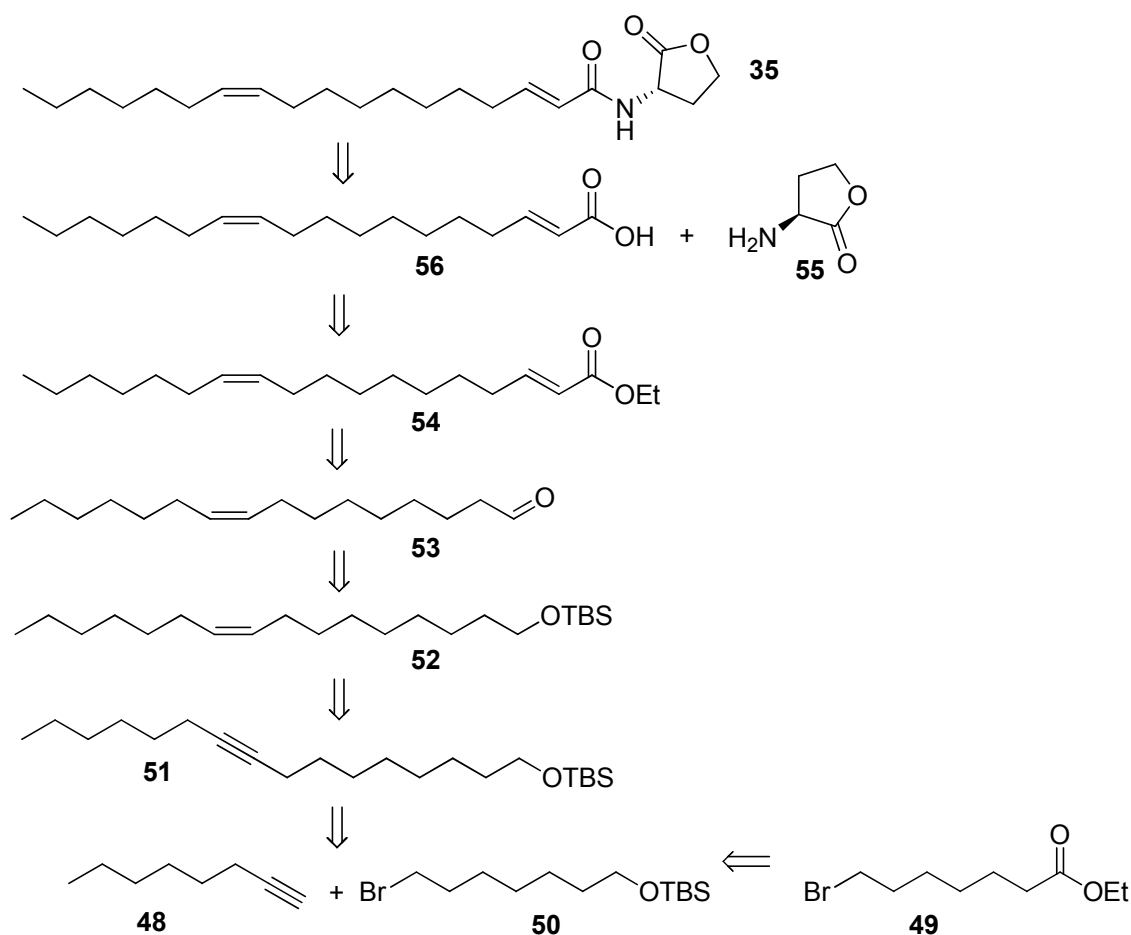


Abb. 33 Retrosyntheseschema des ersten Ansatzes von C18:2-AHL Synthese

Der erste Versuch zum Aufbau der Seitenkette erfolgte direkt mit dem 7-Bromheptansäureethylester (**49**). Allerdings zeigte sich, dass das gewünschte Produkt auf diesem Weg nicht zugänglich war, so dass das Ausgangsreagenz entsprechend modifiziert wurde. Problematisch an der direkten Umsetzung der Edukte war, dass das Alkin-Anion zwei mögliche Angriffsstellen hat. Zum Einen kann die gewünschte S_N2 -Reaktion erfolgen als auch ein nucleophiler Angriff an das Carbonylzentrum.

Um den Ablauf der Reaktion besser steuern zu können wurde daher die Reduktion des 7-Bromheptansäureethylesters (**49**) mit Lithiumaluminiumhydrid zu dem Alkohol und die Schützung der freien Alkoholfunktion mit *tert*-Butyldimethylsilylchlorid durchgeführt. Beide

Reaktionen liefen mit sehr guten Ausbeuten. Somit sollte das Bromid als bessere Abgangsgruppe bei einem nucleophilen Angriff deutlich bevorzugt werden.

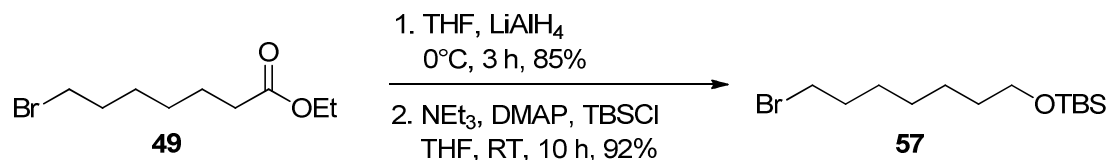


Abb. 34 Darstellung des geschützten Alkohols **57** aus 7-Bromheptansäuremethylester (**49**)

Die Umsetzung des Bromides **57** mit dem 1-Octin (**48**) zu dem gewünschten Produkt war nicht erfolgreich. Um die Reaktivität zu steigern, wurde ein Halogenid-Austausch durchgeführt. Durch die Finkelstein-Reaktion wurde das Bromid gegen Iodid unter Rückfluss in Aceton ausgetauscht. Die Reaktion lieferte sehr gute Ausbeuten.

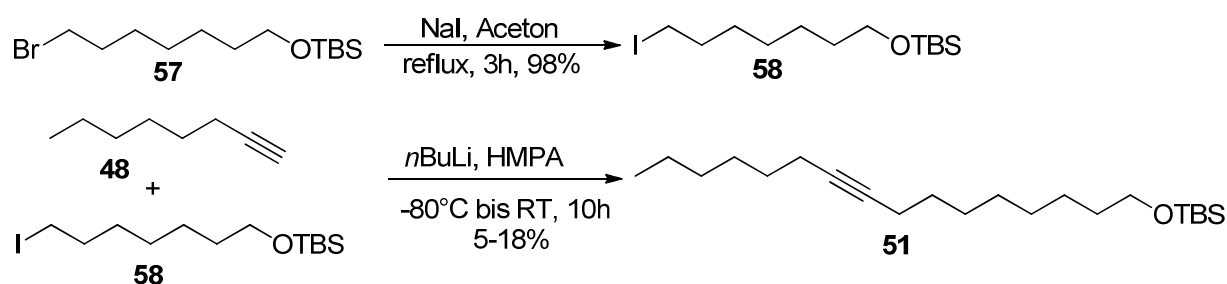


Abb. 35 Darstellung des TBS geschützten 9-Hexadecinol (**51**) durch die Kupplung von 1-Octin (**48**) mit dem Iodid **58**

Doch auch mit dem Iodid **58** konnte nur eine geringe Umsetzung zu dem gewünschten Produkt **51** festgestellt werden. Alternativ gab es noch die Möglichkeit, Zugang zu dem Alkin **51** über eine modifizierte Sonogashira Reaktion mit dem hier verwendeten nichtaktivierten Alkyljodid zu erlangen.^[79] Aufgrund der geringen Anzahl an Publikationen und dem kostenintensiven Katalysator wurde diese Reaktion letztlich verworfen.

3.1.8.2 Zweiter Syntheseansatz von (2E,11Z)-(2,11-Octadecadienoyl)-L-homoserinlaktone

Die zweite Syntheseroute verfolgt eine sehr ähnliche Reaktionsabfolge, lediglich die beiden Edukte wurden so modifiziert, dass die entscheidende *cis*-Doppelbindung nun über eine Wittig-Reaktion aufgebaut werden sollte (Abb. 36). Das Wittig-Salz wurde dabei aus 1-Bromheptan (**60**) gewonnen. Bei dem zweiten Edukt handelt es sich um 1,9-Nonandiol (**62**), welches einseitig mit THP geschützt wurde. Die freie Hydroxygruppe wurde daraufhin zu dem Aldehyd **63** oxidiert. Somit stehen die Ausgangsverbindungen für die Z-selektive Wittig-Reaktionen zur Verfügung. Das daraus resultierende Produkt **64** sollte analog zur ersten Syntheseroute entschützt und oxidiert werden, um anschließend durch eine Horner-Wadsworth-Emmons Reaktion zu dem zweifach ungesättigten Ester **54** zu reagieren. Verseifung und eine EDC gesteuerte Kupplung mit dem Homoserinlaktone **55** sollte dann das gewünschte (2E,11Z)-(2,11-Octadecadienoyl)-L-homoserinlaktone (**35**) ergeben.

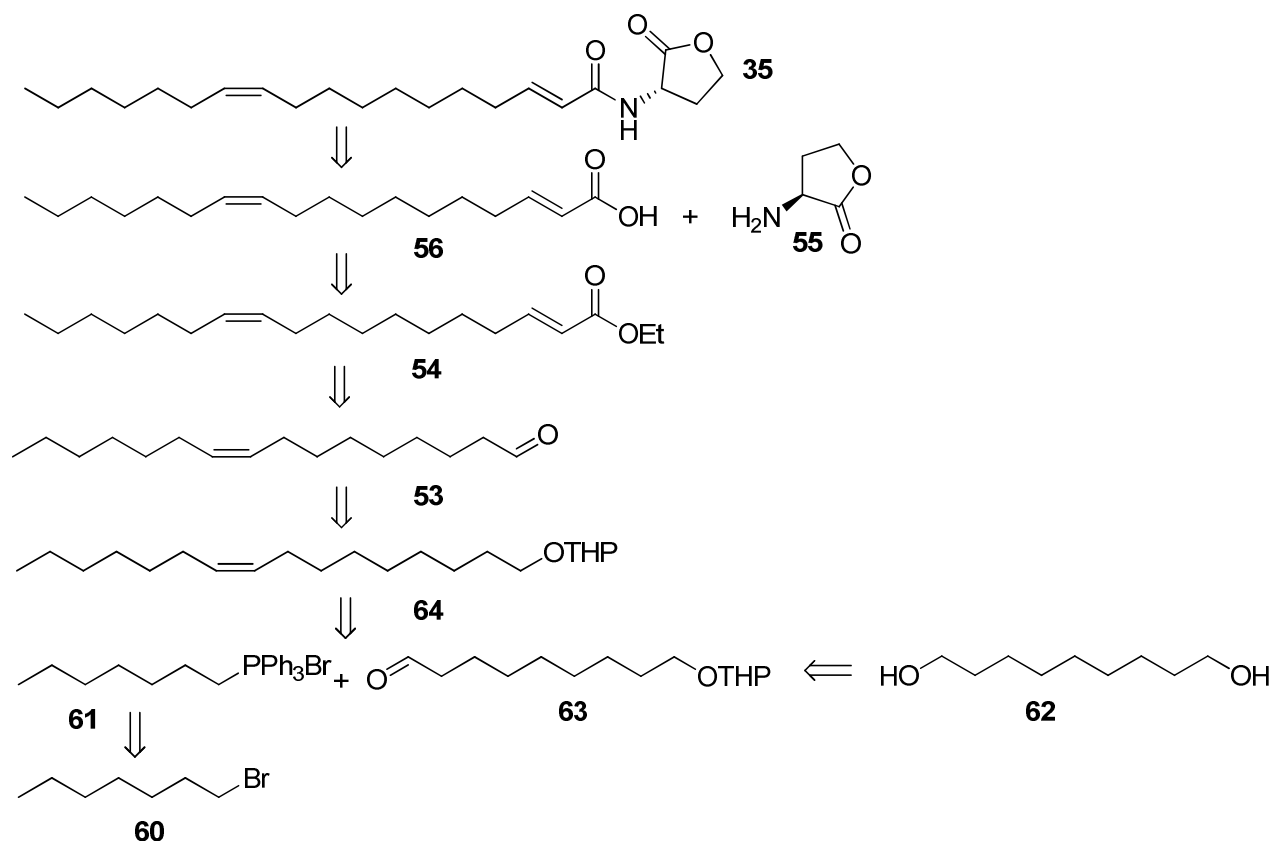


Abb. 36 Retrosyntheseschema des zweiten Ansatzes von C18:2-AHL Synthese

Zur Darstellung des Wittigsalzes **61** ausgehend von 1-Bromheptan (**60**) und Triphenylphosphin konnte in guten Ausbeuten erhalten werden.

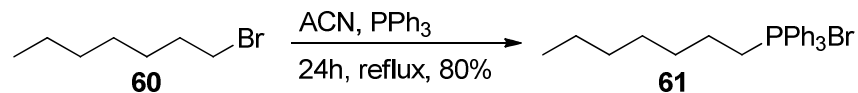


Abb. 37 Darstellung des Wittig-Salzes **61**

Die Darstellung des Mono-THP-geschützten 1,9-Nonandiols **65** verlief in guten Ausbeuten, allerdings tritt als Nebenprodukt auch das Doppel-THP geschützte Verbindung auf, welche durch chromatographische Aufreinigung abgetrennt werden konnte. Die Oxidation mit PCC verlief in mäßigen Ausbeuten, so dass im weiteren Verlauf zur Gewinnung des Aldehydes **63** die Swern-Oxidation eingesetzt wurde.

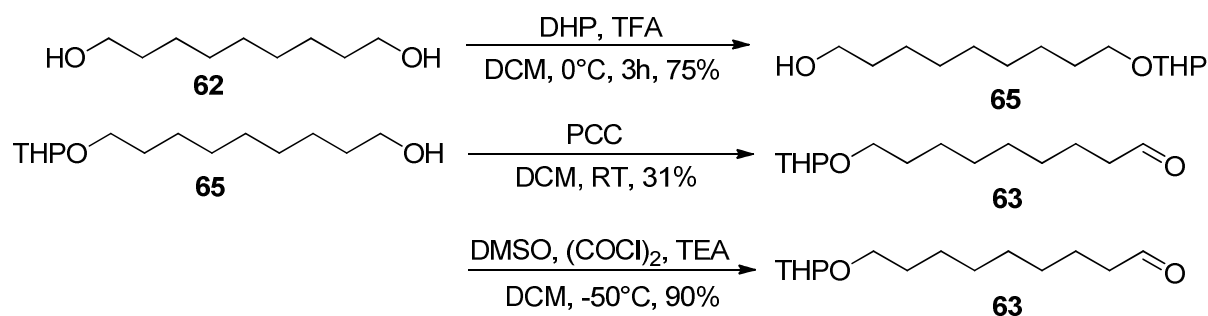


Abb. 38 Darstellung des Aldehyds **63** durch eine Monoschätzung des Diols **62** mit THP und anschließender Oxidation der freien OH-Gruppe

Die Reaktion des Wittigsalzes **61** mit dem Aldehyd **63** lieferte in guten Ausbeuten das Olefin **64** und **66**. Allerdings zeigte sich hier, dass trotz Variation von Reaktionsbedingungen immer beide Doppelbindungskonfigurationen, mit einem *E/Z*-Verhältnis von 1:1.7 bis 1:2.4, entstanden. Aufgrund der schwierigen chromatographischen Auftrennung beider Isomere wurde ein neuer Zugang zu dem C18:2-AHL gesucht.

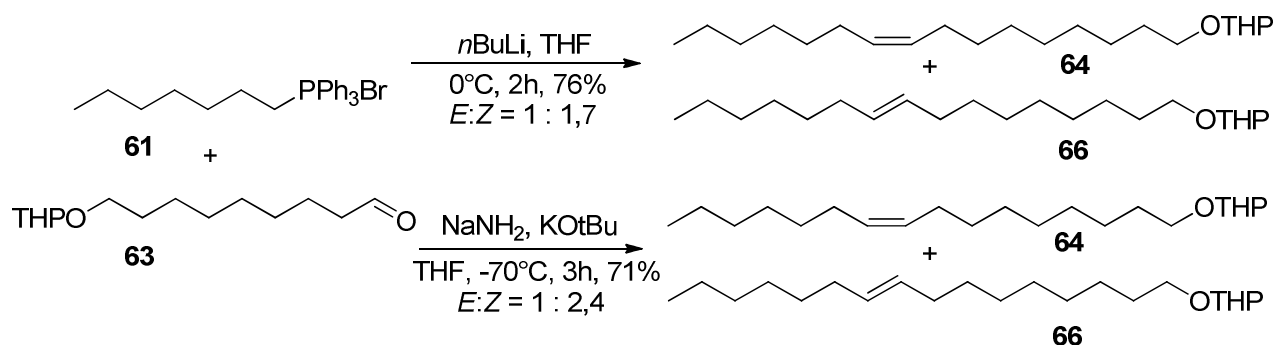


Abb. 39 Darstellung des gewünschten Olefins **66** durch eine Wittig-Reaktion

Prinzipiell bot sich auch die Möglichkeit an, eine Still-Gennari-Variante der Horner-Wadworth-Emmons Reaktion oder Peterson Olefinierung durchzuführen. So wird bei der Peterson Olefinierung, welche das Alken aus einem α -Silylcarbanion und einem Aldehyd darstellt, die Stereochemie durch die Aufarbeitung des Intermediates bestimmt. Der Nachteil ist die sehr aufwendige Darstellung des Silylreagenzes, weswegen diese Route verworfen wurde. Bei der Still-Gennari-Variante der HWE Reaktion erfolgt der Einsatz von Phosphonaten, welche stark elektronenziehende Gruppen enthalten, und Kronenether, welche das Kation der Base abfangen. Durch diese Reaktionsbedingungen wird die Bildung des sonst ungünstigeren Z-Produktes bevorzugt. Allerdings wurde diese Alternative aus kommerziellen Gründen ebenfalls verworfen.

3.1.8.3 Dritter Syntheseansatz von (2E,11Z)-(2,11-Octadecadienoyl)-L-homoserinlaktone

Nachdem der Versuch die Doppelbindung stereoselektiv aufzubauen nicht zufriedenstellend verlief, wurde ein natürlich vorkommender Präkursor gefunden, der die Z-konfigurierte Doppelbindung an der richtigen Position schon mitbringt (Abb. 40).

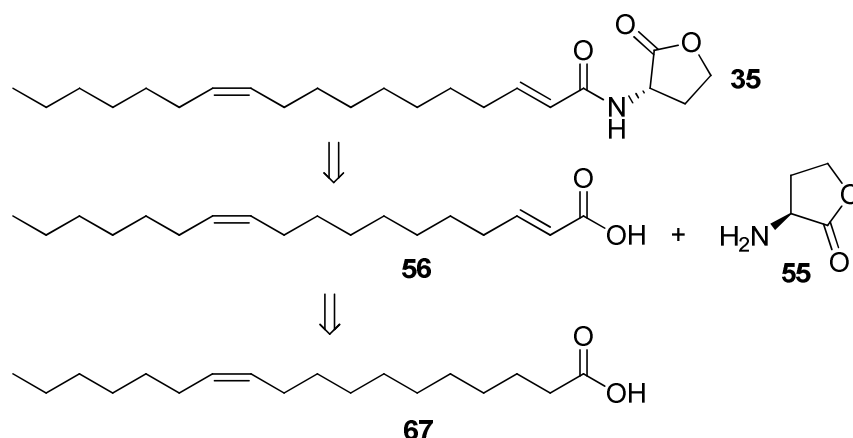


Abb. 40 Retrosyntheseschema des dritten Ansatzes von C18:2-AHL Synthese

Ausgehend von *cis*-11-Vaccensäure (**67**) sollte durch Einsatz von Benzolselenenylchlorid bzw. das Benzolselenenylbromid die Doppelbindung in α,β -Position eingebaut werden. Deprotonierung in α -Position und anschließender Angriff des freien Elektronenpaars auf das Selen unter Abspaltung des Halogenids liefert das Übergangsprodukt **68**, welches unter Oxidation mit Natriumperodat zum Phenylselenoyl-Derivat reagiert. Anschließende Eliminierung liefert den gewünschten (2E,11Z)-2,11-Octadecadiensäureethylester (**69**).^[80]

Die Testreaktionen wurden aufgrund der günstigeren Verfügbarkeit mit Ölsäure (**68**) durchgeführt. Dabei handelt es sich ebenfalls um eine C18-Fettsäure, die Doppelbindung befindet sich aber an der Position C-9. Da die strukturellen Unterschiede sehr gering sind sollten die Ergebnisse problemlos übertragbar sein.

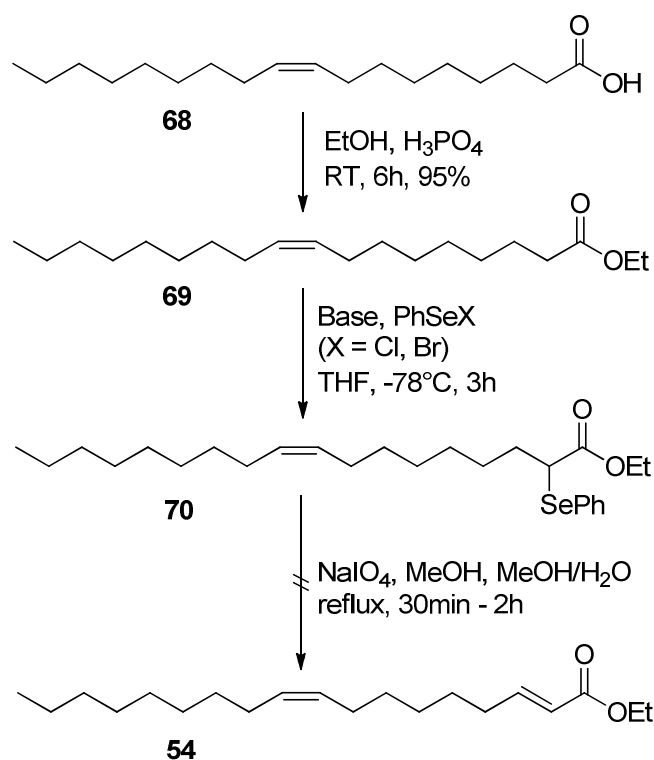


Abb. 41 Darstellung des zweifach ungesättigten Ethylesters **54** ausgehend von Ölsäure (**68**)

Zunächst wurde die *cis*-9-Octadecensäure (**68**) in sehr guten Ausbeuten in den Ethylester **69** überführt. Anschließende Deprotonierung in α -Position gefolgt von dem Angriff auf das Selen bildet das Intermediat **70**, welches direkt mit Natriumperiodat zu dem Phenylselenoyl-Zwischenprodukt reagieren sollte. Aufgrund der somit gebildeten Abgangsgruppe sollte es sofort zur β -Eliminierung kommen und den gewünschten zweifach ungesättigten Fettsäureester **54** bilden. Trotz Verwendung verschiedener Basen wie LDA, NaHMDS, NaH oder Pyridin fand nur eine teilweise Umsetzung zum (11*Z*)-2-Phenylselanyloctadec-11-ensäureethylester (**70**) statt. Die Oxidation mit Natriumperiodat zu dem Phenylselenoyl-Intermediates fand nicht statt. Daher wurde auch dieser Ansatz verworfen.

3.1.8.4 Vierter Syntheseansatz von (2E,11Z)-(2,11-Octadecadienoyl)-L-homoserinlaktone

Eine weitere Route zur Darstellung geht von (9Z)-Palmitoleinsäure (**71**) aus, welche durch eine C2-Kettenverlängerung in eine C18-Fettsäure **56** umgewandelt und anschließend mit dem Homoserinlaktone zu (2E,11Z)-(2,11-Octadecadienoyl)-L-homoserinlaktone (**35**) umgesetzt werden sollte (Abb. 42).

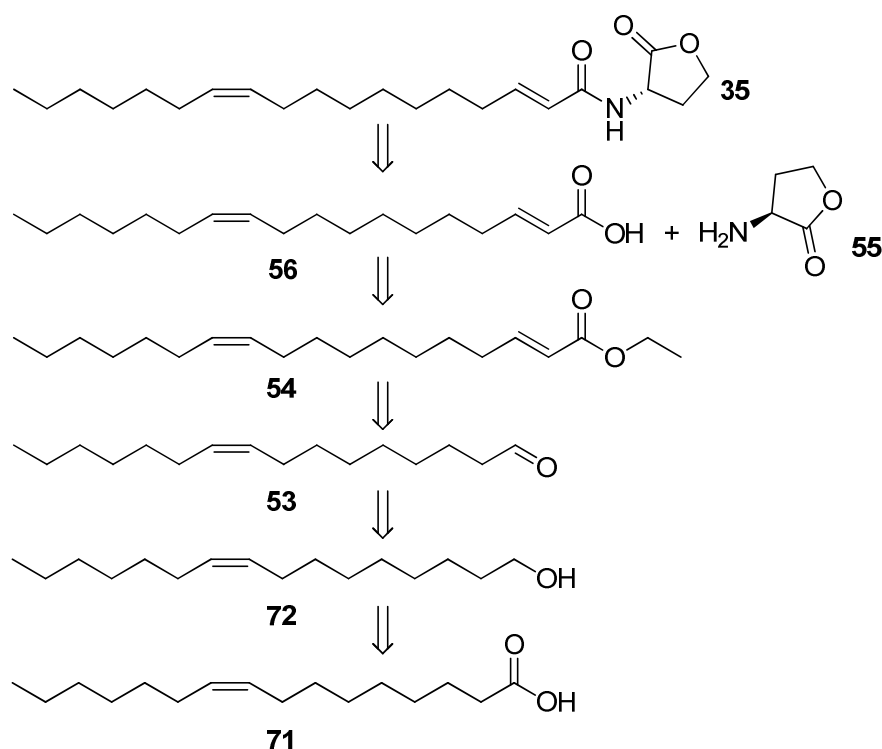


Abb. 42 Retrosyntheschema der C18:2-AHL Synthese

Die Reduktion von *cis*-9-Hexadecensäure (**71**) mit Lithiumaluminiumhydrid liefert in guten Ausbeuten den entsprechenden Alkohol *cis*-9-Hexadecenol (**72**). Dieser wurde in einer Parikh Doering Oxidation zu dem Aldehyd **53** umgesetzt. Die Wahl fiel auf diese Oxidation, da die PCC Oxidation durch die Aufarbeitung häufig schlechtere Ausbeuten lieferte und eine Swern Oxidation von der Reaktionsführung aufwendiger ist, aber keine besseren Resultate liefert.

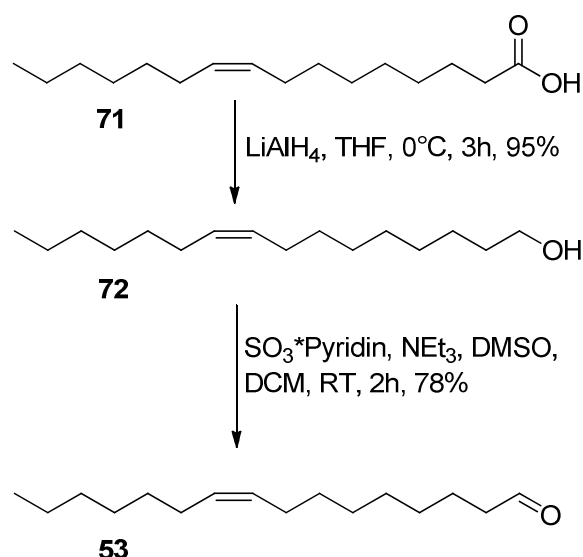


Abb. 43 Darstellung des Aldehyds **53** durch Reduktion der Säure **71** mit LAH und anschließender Parikh Doering Oxidation

Die Darstellung des zweifach ungesättigten Fettsäureesters **54** erfolgte mittels einer Horner-Wadsworth-Emmons Reaktion, welche ebenfalls in guten Ausbeuten verlief. Einzig die Verseifung zur Fettsäure **56** stellte einige Probleme dar, bis mit Natriumhydroxid unter Rückfluss eine geeignete Methode gefunden wurde. Die Verwendung von Lithiumhydroxid oder Natriumhydroxid bei 0°C bzw. Raumtemperatur führte zu keiner Umsetzung.

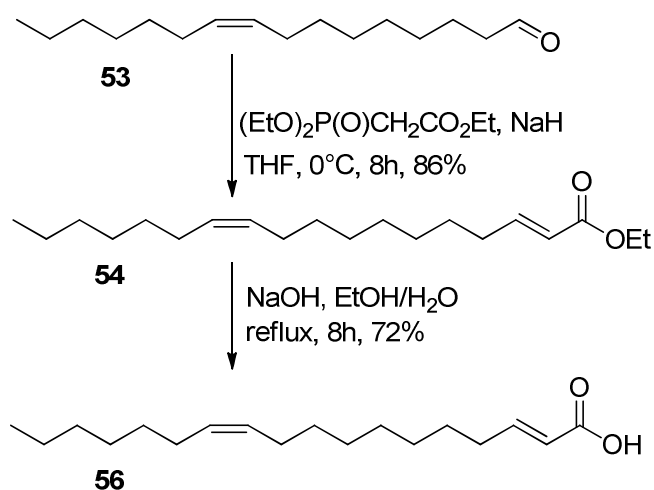


Abb. 44 Darstellung von Seitenkette **56** durch eine Horner-Wadsworth-Emmons Reaktion ausgehend vom Aldehyd **53** und anschließende Verseifung mit Natriumhydroxid

Die Umsetzung der freien Säure **56** mit dem Homoserinlaktone mittels einer EDC vermittelten Kopplung lieferte das gewünschte Produkt (2*E*,11*Z*)-(2,11-Octadecadienoyl)-L-homoserinlaktone (**35**) in guten Ausbeuten.

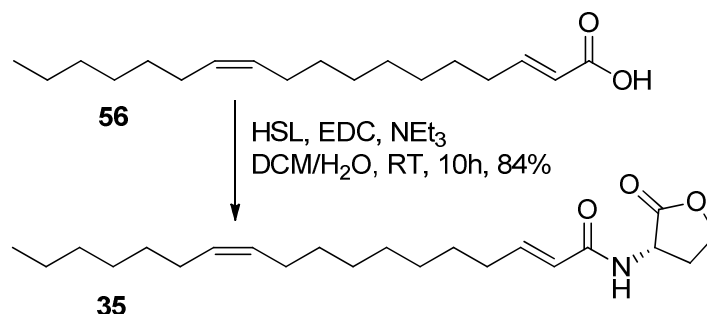


Abb. 45 Darstellung von (2*E*,11*Z*)-(2,11-Octadecadienoyl)-L-homoserinlaktone (**35**)

Die Verwendung von DCM als Lösemittel führte dazu, dass sich nicht alle Edukte vollständig gelöst haben, so dass für die Reaktion ein Gemisch aus DCM/H₂O verwendet wurde. Somit konnte DCC/DMAP für die Kupplungsreaktion nicht mehr verwendet werden, da DCC mit Wasser direkt zu dem entsprechenden Harnsäurederivat reagiert und es somit nicht mehr zur Aktivierung der Säure-Funktion kommt. Daher erfolgte der Einsatz von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) als Alternativreagenz.

3.1.8.5 Synthese von Z-(11-Octadecadienoyl)-L-homoserinlaktone

Durch die Strukturaufklärung mittels DMDS-Derivatisierung konnte die einzige Doppelbindung, die in dem zweiten Signalmolekül vorkommt, aufgrund der typischen Fragmentierung auf Position 11 festgelegt werden. Anhand der vorangegangenen Synthesepipeline ist die (11*Z*)-Vaccensäure (**73**) exakt die Fettsäure, welche durch die Umsetzung mit dem Homoserinlaktone-Baustein das gewünschte Z-11-Octadecenoyl-L-homoserinlaktone (**34**) bildet (Abb. 46).

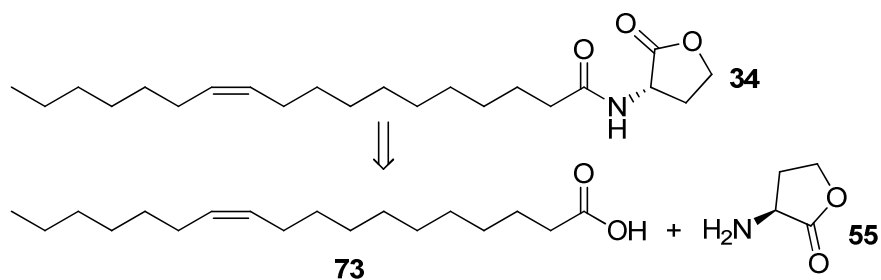


Abb. 46 Retrosyntheseschema der C18:1-AHL Synthese

Die Umsetzung der kommerziell erhältlichen Fettsäure **73** in einer EDC-vermittelten Reaktion mit dem Homoserinlaktone **55** ergibt das gewünschte Produkt **34** in einer sehr guten Ausbeute.

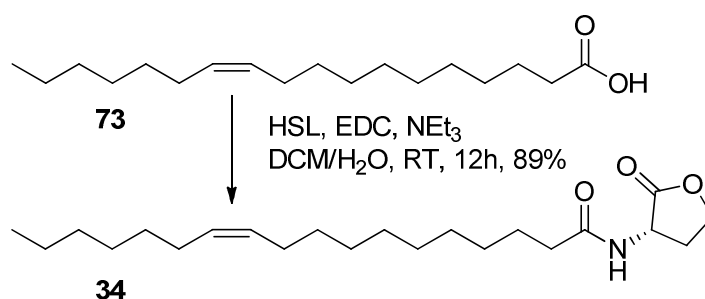


Abb. 47 Darstellung von Z-(11-Octadecadienoyl)-L-homoserinlaktone (**34**)

3.2 Co-Kultur von *Dinoroseobacter shibae* DFL12 mit Algen

Marine Bakterien kommen nicht ausschließlich als freischwebende Zellen im Meer vor, vielmehr sind einige von ihnen an Oberflächen assoziiert. So sind Bakterien von Seegras, Schwämmen, Algen oder weiteren Schwebstoffen isoliert worden. Die Vorteile dieser Assoziation bezüglich der Produktion von Sekundärmetaboliten sind dabei nicht geklärt. Allerdings gibt es Fälle, in denen beschrieben ist, dass es eine symbiotische Beziehung zwischen dem Bakterium und der Alge gibt. Roseobakterizide gehören zu einer Klasse von Verbindungen, die auf die Symbiose von *Phaeobacter inhibens* DSM17395 mit *Emiliania huxleyi* zurückzuführen sind, und von CLARDY *et al* aufgeklärt wurden.^{[5][45]}

Während dieser Arbeit wurden viele Analysen der Sekundärmetabolite von *D. shibae* durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass dieses Bakterium sehr wenige extrazelluläre Metabolite produziert. Die AHLs, welche in dieser Arbeit vorgestellt wurden, gehören zu den wenigen Verbindungen, welche mittels GC/MS Analytik dem Bakterium zugeordnete werden konnten. Um das Metabolitenprofil auch unter anderen Kultivierungsbedingungen zu beobachten, sollte das Zusammenwirken zwischen dem Bakterium und Dinoflagellaten bzw. Mikroalgen untersucht werden. Um den Einfluss genauer zu betrachten, wurden *Prorocentrum minimum* und *Isochrysis galbana* zunächst in Monokultur kultiviert und analysiert.

3.2.1 *Prorocentrum minimum* CCMP1329



Abb. 48 Zelle von *Prorocentrum minimum* ^[81]

Prorocentrum minimum ist ein Dinoflagellat und gehört zu den algenblütenbildenden Arten. Es bildet kleine Zellen in unterschiedlichen Formen (oval, triangular und herzförmig) von 14-22 µm Länge und 10-15 µm Breite. Das auffälligste Merkmal sind die goldbraunen Chloroplasten. Das Verbreitungsgebiet reicht von kühlem Salzwasser bis hin zu tropischen Gewässern.^[82] *P. minimum* ist bekannt für die Produktion der toxischen Verbindungen Venerupin und Okadasäure.^[83]

Die Kultivierung von *Prorocentrum minimum* fand auf L1 Medium statt. Die Arbeitsgruppe von WAGNER-DÖBLER hat bei Wachstumstests herausgefunden, dass dieser Dinoflagellat eine Auxotrophie für zwei essentielle Vitamine zeigt. Dabei handelt es sich um Thiamin (Vitamin B1) und Cobalamin (Vitamin B12). Bei den untersuchten Extrakten wurden diese beiden Vitamine dem Medium hinzugefügt (L1V), um das Wachstum zu gewährleisten.

Bei der Gewinnung der Extrakte wurden dabei zwei unterschiedliche Verfahren verwendet. Zum Einem wurde das Adsorbens XAD-16 eingesetzt, welches bereits erfolgreich bei dem Nachweis der AHLs aus *Dinoroseobacter shibae* benutzt wurde. Das gefilterte Adsorbens wurde mit Methanol gewaschen und die organische Phase konzentriert und mittels GC/MS analysiert. Zum Anderem wurden in die Gasphase abgegebene Substanzen über der Flüssigkultur mit einer CLSA-Anlage auf einem Aktivkohlefilter adsorbiert. In dieser geschlossenen Glasapparatur wurde dabei ein kontinuierlicher Luftstrom über 40 Stunden über die Lösung geleitet. Die Extraktion des Filters erfolgte anschließend mit Dichlormethan, welches konzentriert ebenfalls mittels GC/MS analysiert wurde. Die Kultivierung des Dinoflagellaten wurde aufgrund der Toxizität von in der Gruppe WAGNER-DÖBLER durchgeführt.

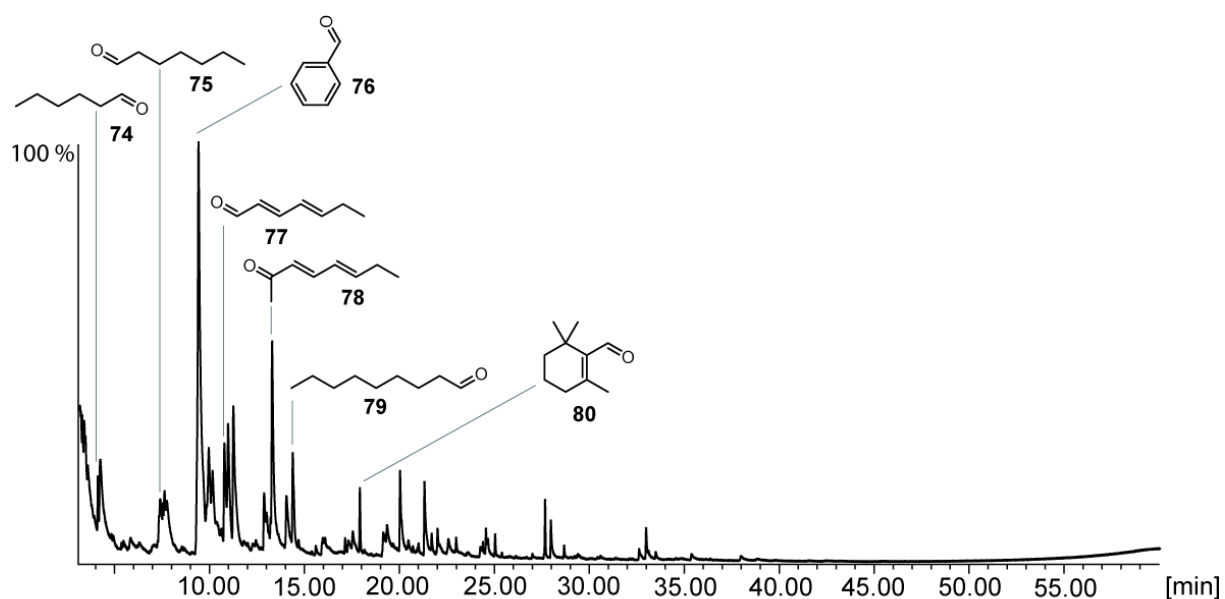


Abb. 49 Totalionenstrom-Chromatogramm *Prorocentrum minimum* Kontrollkultur in L1V Medium (CLSA Extrakt)

Das Metabolitenprofil des CLSA Extraktes zeigte im Wesentlichen Aldehyde (**74-77**, **79**, **80**) und Ketone (**78**). Dabei treten wie im Chromatogramm gezeigt nicht nur einfache gesättigte Aldehyde wie Hexanal (**74**), Heptanal (**75**) usw. auf, sondern auch Aldehyde, welche einfach oder mehrfach ungesättigt sind.

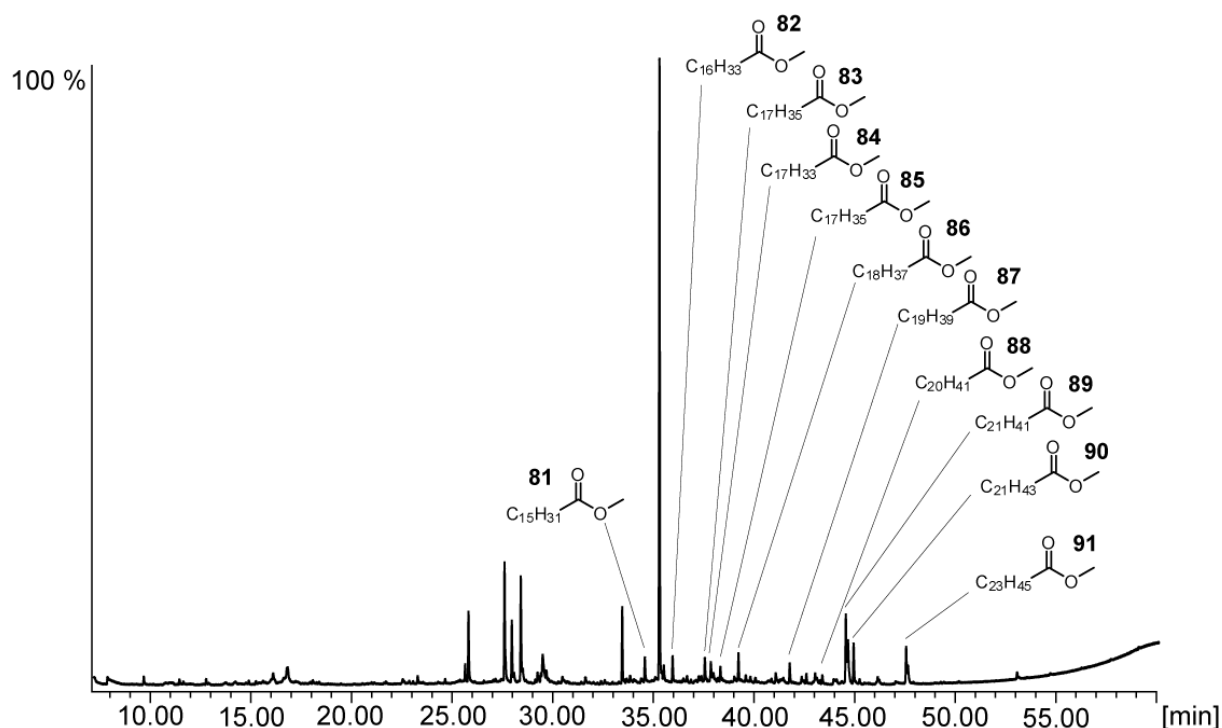


Abb. 50 Totalionenstrom-Chromatogramm *Prorocentrum minimum* Kontrollkultur in L1V Medium (XAD Extrakt)

Die Verbindungen, welche im XAD Extrakt identifiziert wurden sind, gehören zum großen Teil zu der Gruppe der Methylester (**81-91**). Dabei variieren die Kettenlängen von C16 bis C23, wobei vereinzelt Methylverzweigungen beziehungsweise Doppelbindungen auftreten.

Wie aus den beiden Chromatogrammen aus der Kontrollkultur des Dinoflagellaten zu erkennen ist, gibt es erhebliche Unterschiede, je nachdem welche Methode verwendet wurde. So konnten durch Einsatz der CLSA vor allem leichtflüchtige Verbindungen angereichert werden. Dies zeigt sich daran, dass die meisten Peaks im Retentionsbereich von 5 bis 30 Minuten liegen. Bei der XAD Extraktion ergibt sich ein ganz anderes Bild. Hier sind im Extrakt fast ausschließlich schwerer flüchtige Verbindungen enthalten, so dass die meisten Komponenten zwischen 25 und 45 Minuten retendieren.

3.2.2 *Isochrysis galbana* CCMP1323

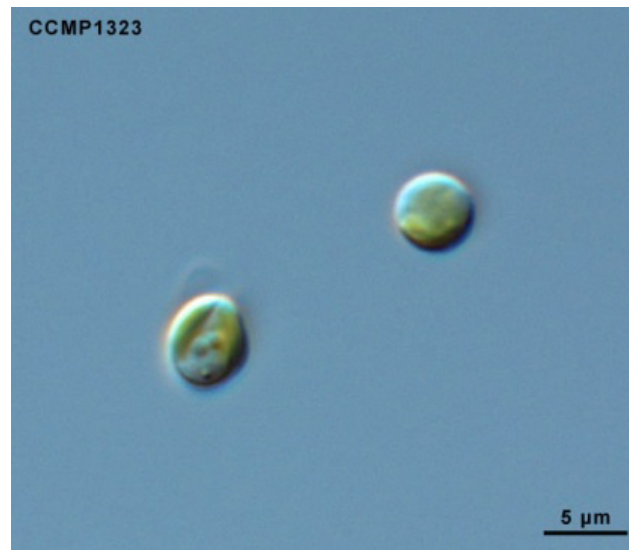


Abb. 51 Zellen von *Isochrysis galbana*^[84]

Isochrysis galbana gehört zu den sehr gut untersuchten Mikroalgen mit einer Größe von 4-6 µm Länge und 2-4 µm Breite. Die Alge wird vor allem in der Aquakultur verwendet, da sie in der Lage ist mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie zum Beispiel Docosahexensäure oder Eicosapentensäure zu produzieren.^[85] Auch dieser Organismus weist eine Auxotrophie für Cobalamin auf.^[86] Die Kultivierung wurde analog zu dem Dinoflagellat in L1V durchgeführt. Hier ergab die Auswertung der Extrakte, dass *Isochrysis galbana* keine Metabolite produziert oder diese deutlich unter dem Detektionslevel des GC/MS Gerätes lagen.

3.2.3 Co-Kultur von *Dinoroseobacter shibae* mit *Prorocentrum minimum*

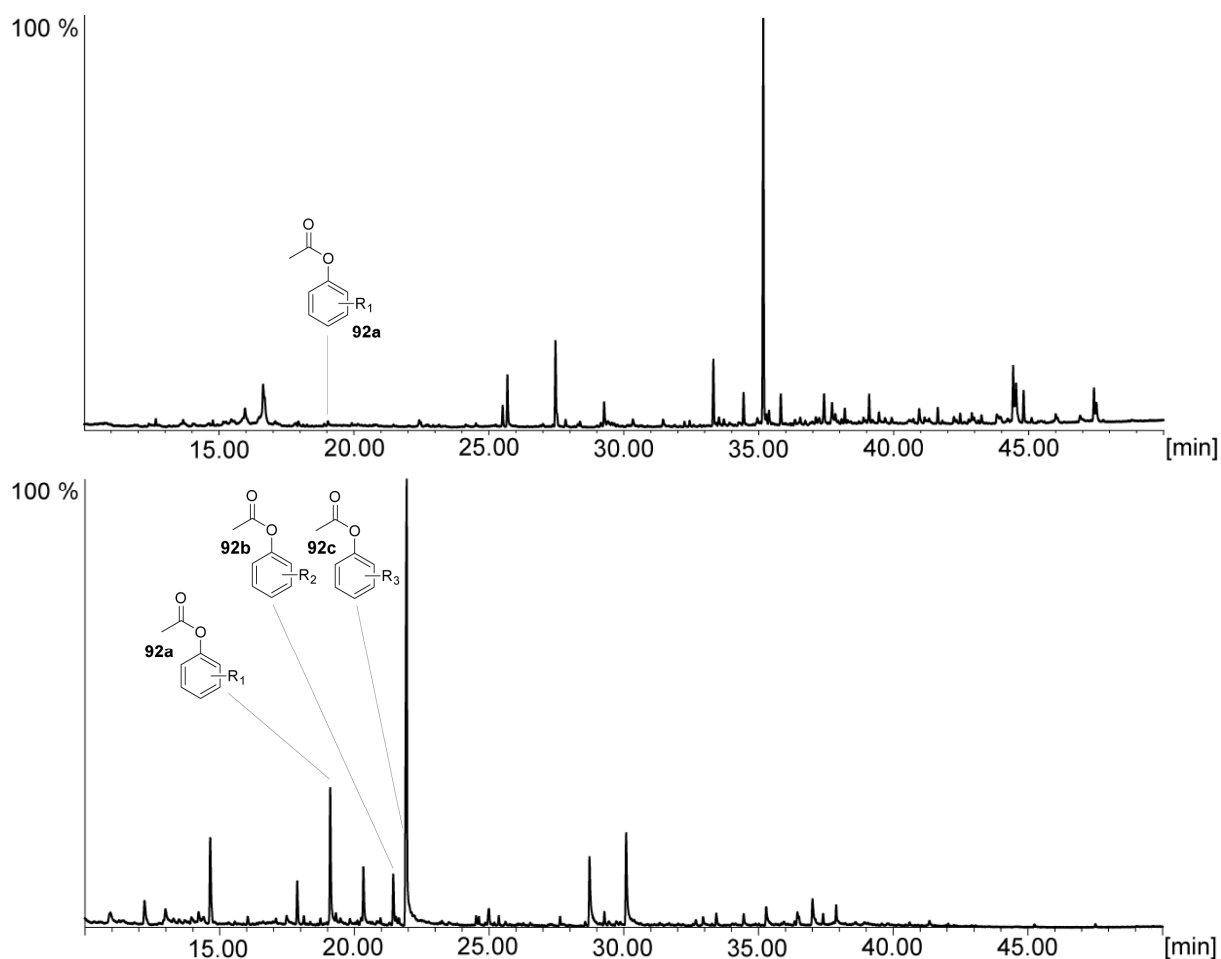


Abb. 52 Totalionenstrom-Chromatogramm der Co-Kultur in L1V Medium ohne Thiamin (oben XAD, unten CLSA)

Von der Co-Kultur wurde sowohl das Duftprofil mit CLSA als auch die Kulturlösung mit XAD analysiert. Die Chromatogramme unterscheiden sich dabei deutlich von denen des Dinoflagellaten in Reinkultur. *Dinoroseobacter shibae* zeigt in L1V Medium überhaupt keine Metabolite, da es auf diesem Mineralmedium alleine nicht wachsen kann. Die Veränderungen im Metabolitenprofil können daher sowohl vom Bakterium wie auch vom Dinoflagellat zurückzuführen sein. Im CLSA Extrakt konnten insgesamt drei neue Verbindungen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte nur einer dieser Metabolite

im XAD Extrakt detektiert werden. Es handelt sich um acetylierte und alkylierte Phenylverbindungen mit Molekülmassen von 164 g/mol und 178 g/mol.

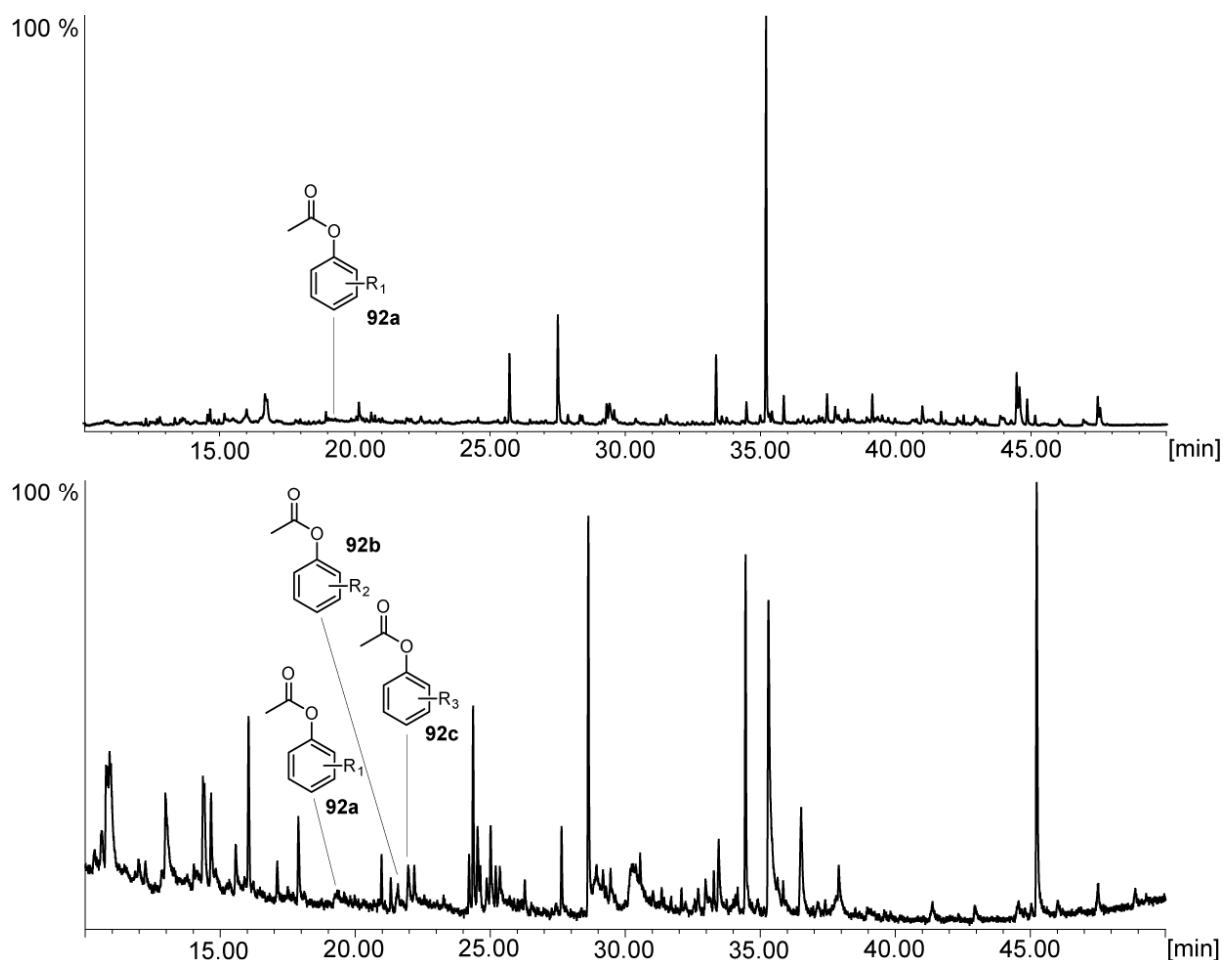


Abb. 53 Totalionenstrom-Chromatogramm der Co-Kultur in L1V Medium ohne Cobalamin (oben XAD, unten CLSA)

Die Chromatogramme der Co-Kulturen ohne Cobalamin zeigen ein ähnliches Ergebnis wie die Co-Kulturen ohne Thiamin. Auch hier sind im CLSA Extrakt drei dieser Phenylderivate detektierbar, im XAD-Extrakt lediglich eines. Die Intensität der Peaks unterscheidet sich aber deutlich gegenüber denen der vorangegangenen Kulturen. In diesem Fall sind diese neuen Metabolite nur in sehr geringer Konzentration in den Extrakten enthalten. In beiden Versuchen konnten jeweils die gleichen Phenylderivate nachgewiesen werden, da der Retentionsindize identisch ist.

3.2.4 Co-Kultur von *Dinoroseobacter shibae* mit *Isochrysis galbana*

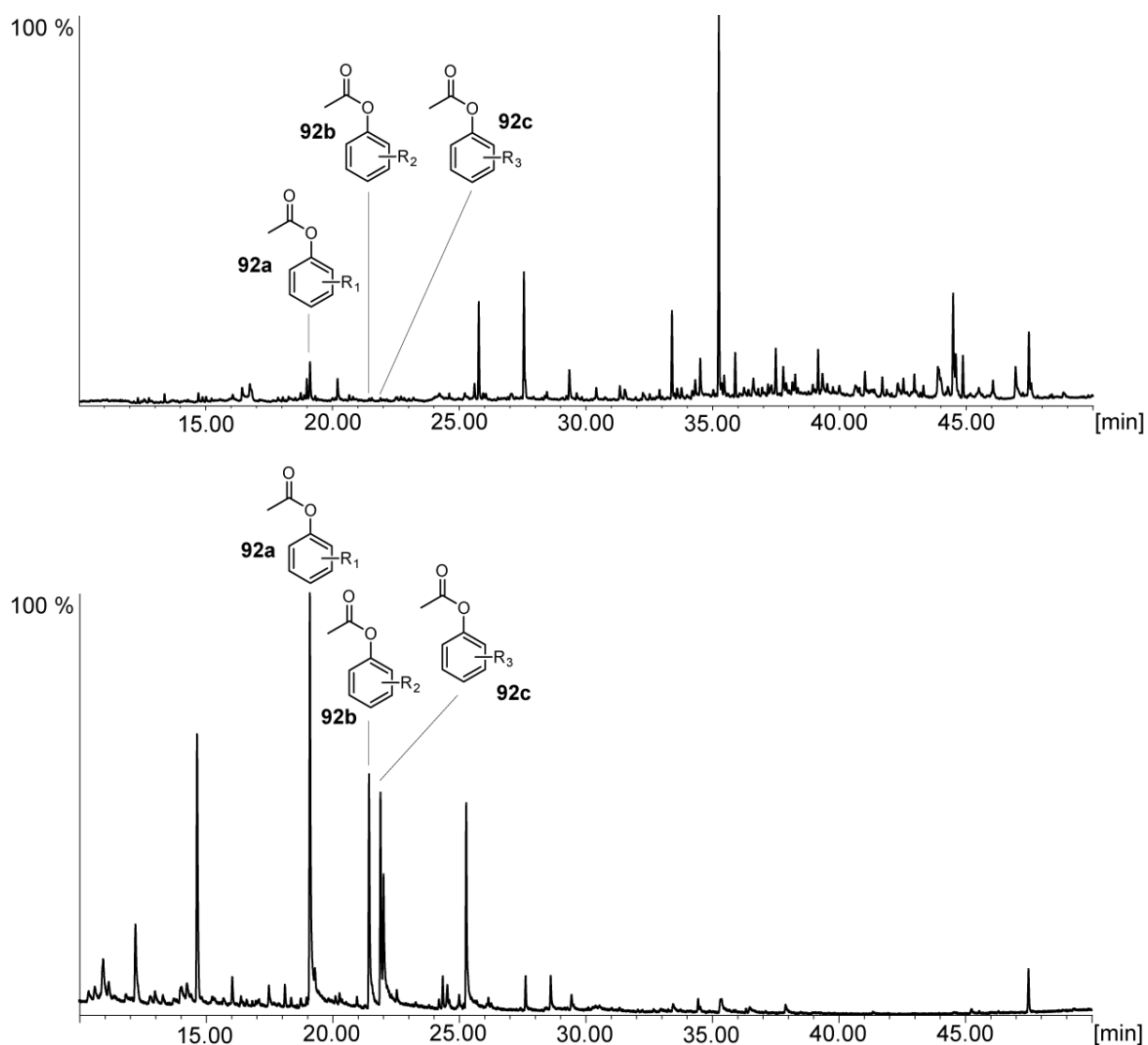


Abb. 54 Totalionenstrom-Chromatogramm der Co-Kultur in L1V Medium ohne Thiamin (oben XAD, unten CLSA)

Die Kulturen aus *Isochrysis galbana* in Co-Kultur mit *Dinoroseobacter shibae* wurden ebenfalls sowohl mittels CLSA und XAD analysiert. Das Chromatogramm der Duftanalyse zeigt die drei bereits in der Co-Kultur von *Prorocentrum minimum* und *Dinoroseobacter shibae* gefundenen Phenylderivate in sehr hoher Konzentration. Ebenso war es möglich dieselben drei Verbindungen im XAD-Extrakt nachzuweisen. Ein Vergleich der

Retentionsindizes ergab eine Übereinstimmung sowohl mit CLSA mit dem XAD Extrakt als auch mit den Phenylacetaten aus *P. minimum* mit *D. shibae*.

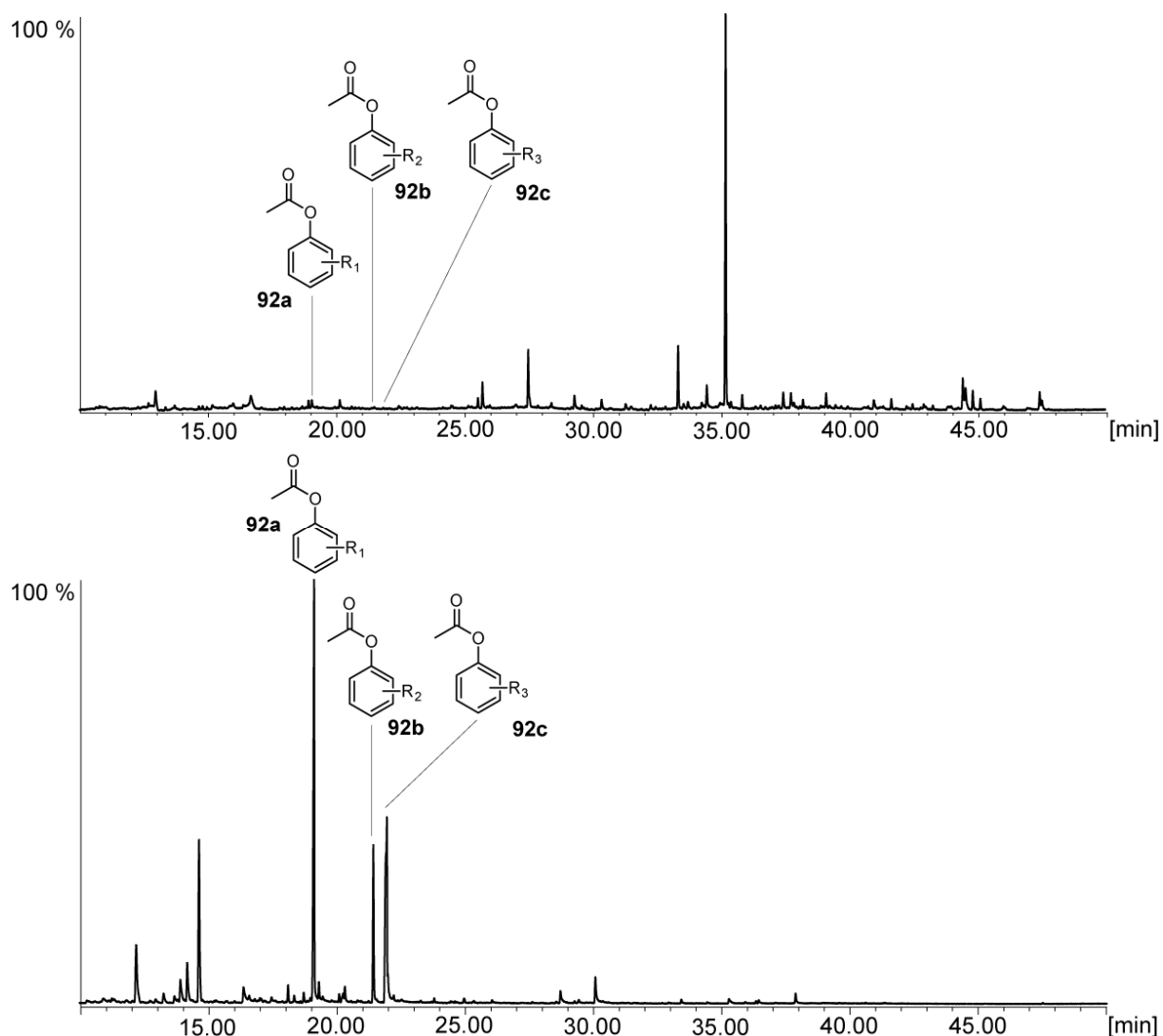


Abb. 55 Totalionenstrom-Chromatogramm der Co-Kultur in L1V Medium ohne Cobalamin (oben XAD, unten CLSA)

Die Chromatogramme der Co-Kultur in L1V Medium ohne Cobalamin unterscheiden sich kaum mit denen im L1V Medium ohne Thiamin. In den CLSA-Extrakten sind die drei Phenylacetate als Hauptkomponenten enthalten, während diese in den XAD Extrakten nur in sehr geringer Konzentration vorkommen. Der Vergleich der Retentionsindize bestätigt, dass es sich wieder um die gleichen drei Metabolite handelt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich das Metabolitenprofil der Monokulturen mit denen der Co-Kulturen unterscheiden, wobei sich die offensichtlichste Veränderung anhand der Duftextrakte nachweisen ließen. In allen gewonnen Extrakten konnten neue Verbindungen detektiert werden. Unabhängig mit welchem Organismus *Dinoroseobacter shibae* DFL12 kultiviert wurde, konnten immer dieselben drei Phenylacetate bestimmt werden. Dies legt den Schluss nahe, dass das Bakterium diese Verbindungen produziert. Welche Funktion diese Metabolite besitzen wurde in den Experimenten nicht aufgeklärt. Um weitere mögliche neue Verbindungen aus den Co-Kulturen zu bestimmen, wurden außerdem noch Derivatisierungen der Extrakte durchgeführt. Dazu wurden zum Einem die Proben mit MSTFA und zum Anderem mit Chlorameisensäureethylester behandelt. Ziel dieser Versuche war die Herabsetzung der Polarität einzelner funktioneller Gruppen, um diese besser im GC/MS detektieren zu können. Allerdings konnten keine neuen Metabolite bzw. deren Derivate nachgewiesen werden.

3.2.5 Strukturaufklärung und Synthese der Phenylacetate

Um die postulierte Struktur aus den Co-Kulturen zu bestätigen, wurden zuerst die Massenspektren auf nähere Strukturinformationen durchsucht. Alle Spektren weisen die Fragment-Ionen $m/z = 77$ und $m/z = 91$ auf, welches das Grundgerüst des Metaboliten darstellt. Ansonsten zeigen ebenfalls alle drei Verbindungen eine Abspaltung von $m/z = 42$ sowie das Fragment $m/z = 43$. Dies ist eine charakteristische Fragmentierung, welche bei Acetatfunktionen auftritt.

Basierend auf der Annahme, eines acylierten Phenols als Grundgerüst ergeben sich für die erste Verbindung **92a** zwei Möglichkeiten. Zum Einem ist eine Ethylgruppe oder aber zwei Methylgruppen als Substitution am Grundgerüst denkbar (Abb. 56). An welchen Positionen sich diese Alkylreste befinden ist anhand des Massenspektrums aber nicht erkennbar. Zur Verifizierung dieser Annahme ist die Synthese der Verbindung unerlässlich.

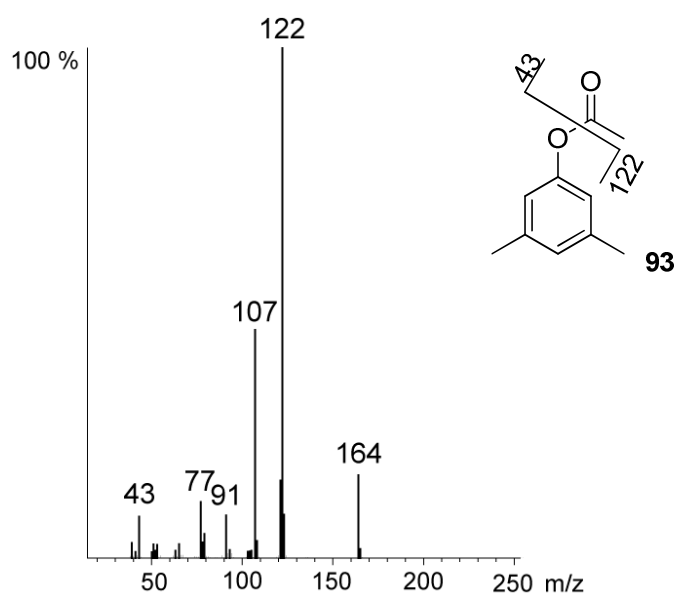


Abb. 56 Massenspektrum des Phenylacetates **92a** RT = 19.1 min

Im Unterschied zu der ersten Verbindung weisen die zwei anderen Metabolite **92b** und **92c** eine um 14 g/mol höhere Molekülmasse auf. Aufgrund des Vorhandenseins der Fragmente $m/z = 77$ und $m/z = 91$ sowie der Abspaltung von 42 g/mol ist davon auszugehen, dass es sich um das gleiche Grundgerüst handelt (Abb. 57). Lediglich das Vorhandensein einer weiteren CH_2 -Gruppe, deren Position am Molekül anhand der Massenspektren nicht festgelegt werden kann, unterscheidet diese beiden Strukturen von der ersten.

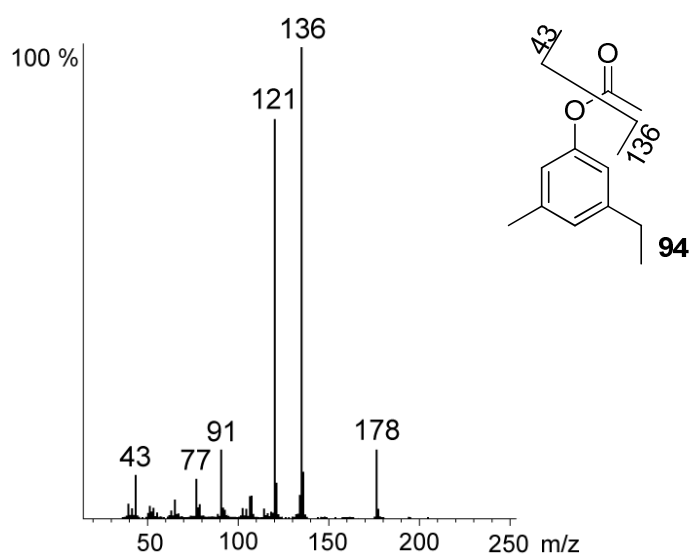


Abb. 57 Massenspektrum des Phenylacetates **92b** RT = 21.3 min

Der Vergleich der Massenspektren der beiden Phenylacetate mit der Masse 178 g/mol zeigt keine offensichtlichen Unterschiede. Weder in der Fragmentierung noch in der Intensität einzelner Fragment-Ionen sind Differenzen erkennbar (Abb. 58). Basierend auf den verschiedenen Retentionszeiten lässt sich der strukturelle Abweichung auf das Substitutionsmuster der Alkylgruppen am Phenylgerüst zurückführen. Dies sollte nachfolgend durch die Synthese diverser Phenylacetat-Verbindungen aufgeklärt werden.

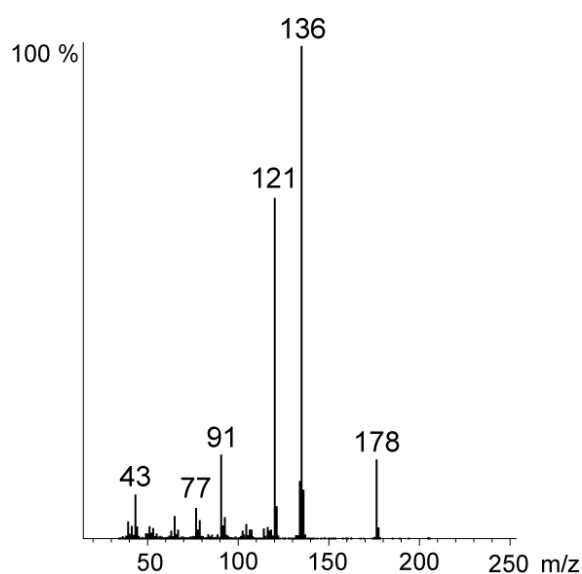


Abb. 58 Massenspektrum des Phenylacetates **92c** RT = 21.9 min

Die Synthese der Verbindungen erfolgte durch Umsetzung verschieden alkylierter Phenole mit Essigsäurechlorid in exzellenter Ausbeute (Abb. 59). Die Variation der Substitution der Methyl- und Ethylgruppen wurde dabei durch die kommerziell erhältlichen Phenolderivate begrenzt.

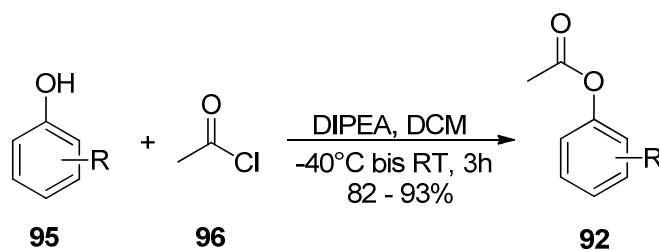


Abb. 59 Darstellung des Phenylacetats **92** ausgehend von Phenolderivat **95** und Essigsäurechlorid (**96**)

Durch anschließende Analyse der Fragmentierungsmuster und Retentionszeiten wurden die Massenspektren mit denen aus den Co-Kulturen verglichen. Dabei konnten ein Teil der Verbindungen verifiziert werden.

Bei der Auswertung diverser Spektren von Dimethylphenylacetaten konnte der Metabolite mit der Masse 164 g/mol identifiziert werden (Abb. 60). Dabei handelt es sich um das 3,5-Dimethylphenylacetat (**93**). Der Abgleich der Massenspektren ist nahezu identisch. Ebenso stimmen die Retentionsindize mit $R_{I, \text{nat}} = 1283$ mit $R_{I, \text{syn}} = 1281$ sehr gut überein.

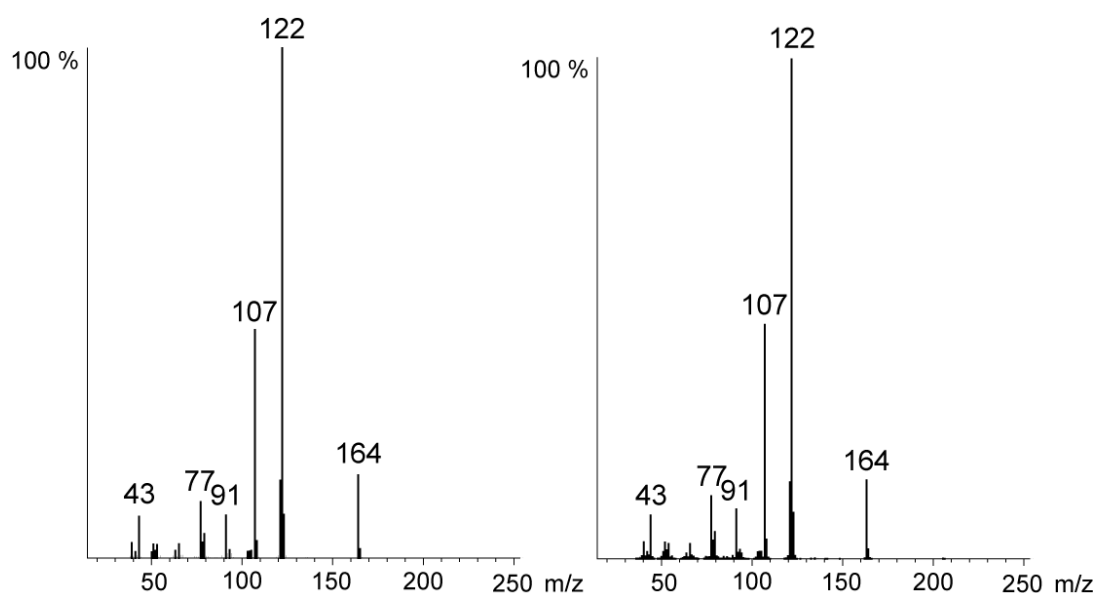


Abb. 60 Vergleich der Massenspektren der nicht verifizierten Verbindung **92a** (links) aus dem Naturextrakt mit dem synthetisierten 3,5-Dimethylphenylacetat (**93**) (rechts)

Analog wurde bei der Identifizierung der beiden nicht verifizierten Strukturen mit der Masse von 178 g/mol vorgegangen (Abb. 61). Dabei wurden sowohl Trimethylphenylacetate, Methylethylphenylacetate und Propylphenylacetate untersucht. Durch Vergleich der Massenspektren und Retentionsindizes konnte eine Verbindung eindeutig als 3-Ethyl-5-Methylphenylacetat (**94**) identifiziert werden. Diese beträgt für die Naturverbindung $R_{I, \text{nat}} = 1352$ und für die synthetisierte Verbindung $R_{I, \text{syn}} = 1349$.

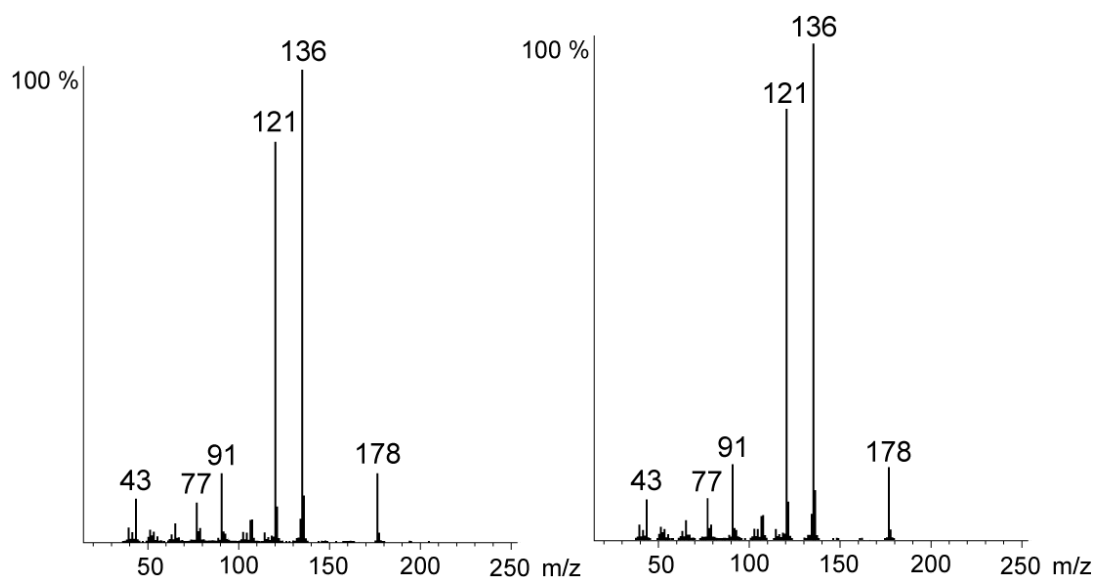


Abb. 61 Vergleich der Massenspektren der nicht verifizierten Verbindung **92b** (links) aus dem Naturextrakt mit dem synthetisierten 3-Ethyl-5-Methylphenylacetat (**94**) (rechts)

Alle anderen synthetisierten Phenylacetate zeigten zwar sehr ähnliche Massenspektren, allerdings passten die Retentionszeiten nicht zu der der Naturprobe. Somit bleibt die genaue Struktur der letzten der Verbindungen mit dem Retentionsindize von $R_{i, \text{nat}} = 1367$ ungeklärt. Am aussichtsreichsten waren die Ethyl-Methyl-Phenylacetate, da diese die höchsten Retentionsindizes aufwiesen. Das 2-Isopropyl- (**97**) und 4-Isopropylphenylacetat (**98**) sowie das 2,4,6-Trimethylphenylacetat (**99**) konnten somit definitiv ausgeschlossen werden.

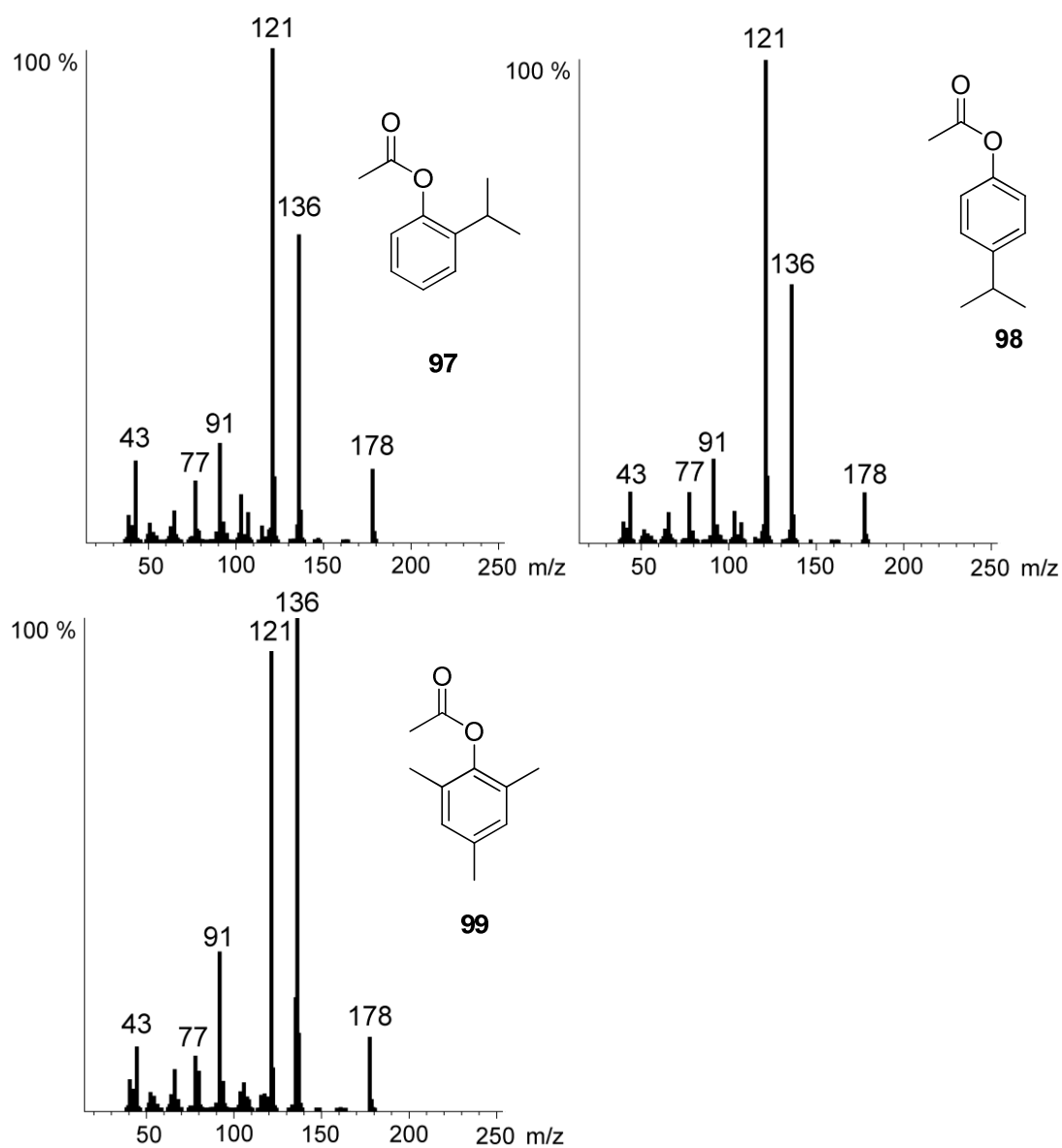


Abb. 62 Massenspektren der synthetisierten Verbindungen 2-Isopropylphenylacetat (**97**)(oben links), 4-Isopropylphenylacetat (**98**) (oben rechts) und 2,4,6-Trimethylphenylacetat (**99**)(unten links)

3.3 *Phaeobacter inhibens* DSM17395

3.3.1 Allgemeines

Phaeobacter inhibens DSM17395, ursprünglich als *Phaeobacter gallaeciensis* DSM17395 bezeichnet, ist der zweite untersuchte Modellorganismus in dieser Arbeit. Dieses Bakterium ist weltweit im marinen Ökosystem beheimatet, darunter zählen verschiedene Fundorte wie die Nordsee und die Ostküste Nordamerikas. Durch 16S rRNA Untersuchungen des Bakteriums aus der Sammlung der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) und dem CIP (Collection of Institut Pasteur, Paris) wurde eine größere Übereinstimmung mit dem *Phaeobacter inhibens* DSM16374 als zu dem *Phaeobacter gallaeciensis* BS107 festgestellt, welches zur Neuklassifizierung führte.^[87]

Phaeobacter inhibens gehört zu den Gram-negativen aeroben Bakterien, welcher phänotypisch eine stäbchenförmige Form besitzt. Eine weitere offensichtliche Besonderheit ist die bräunliche Färbung der Bakterien, die auf ein noch nicht nachgewiesenes Farbpigment zurückzuführen ist.^[88] Experimente legen dabei nahe, dass es sich um ein Eisen-chelatisierendes Pigment handelt, da die Kulturen von *Phaeobacter inhibens* DSM17395, welche auf oder in Medium ohne Eisen gewachsen sind, farblos blieben. Auch das Ausfällen von Eisen führte zur Entfärbung der Flüssigkulturen. Fügte man anschließend Eisen wieder hinzu, so stellte sich wieder die charakteristische braune Färbung ein. Untersuchungen des Kerngenomes und der drei Plasmide haben ein Siderophore Biosynthese Gencluster auf zwei der Plasmide lokalisiert. Die genaue Struktur der Siderophore ist aber noch unbekannt.^[89]

Die Produktion von Sekundärmetaboliten ist eine wichtige Eigenschaft vieler Bakterien. Bei der Analyse des Bakteriums wurden eine Vielzahl kleiner schwefelhaltiger Verbindungen wie u.a. Dimethyldisulfid, S-Methylpropanthioat und Dimethyltrisulfid (**101**) gefunden. Aber auch Metabolite wie Tropon (**103**) und Tropolon (**104**) sind charakteristisch (Abb. 63). Der wohl interessanteste Aspekt an *Phaeobacter inhibens* DSM17395 ist die Produktion des Antibiotikums Tropodithiätsäure (**106**)(Abb. 64). Daneben ist in vorangegangenen Untersuchungen das Signalmolekül 3-Hydroxy-C10-AHL **107** nachgewiesen worden.^[90]

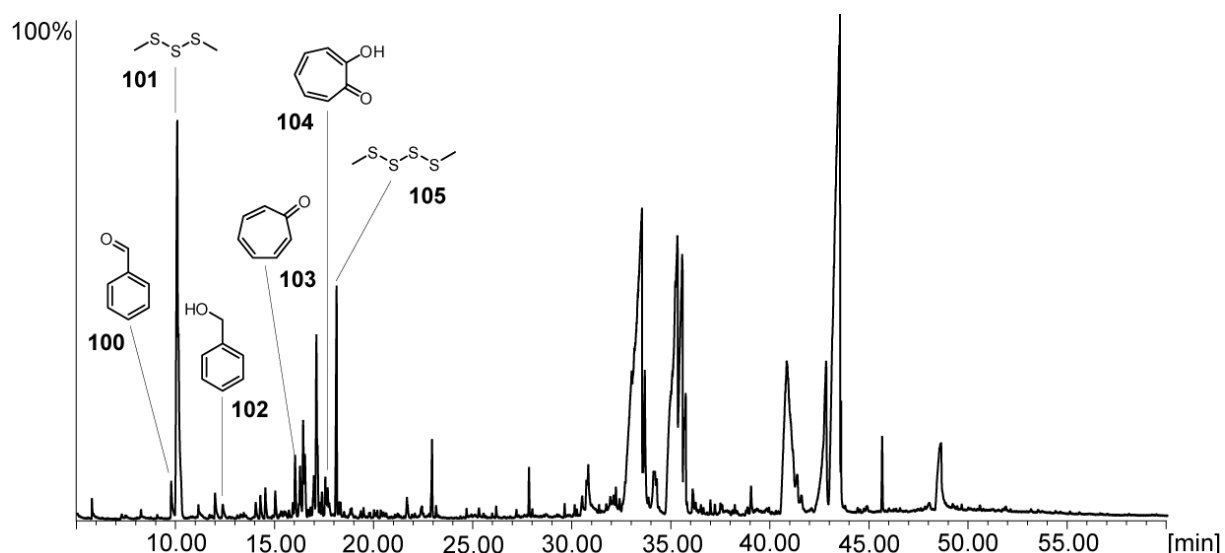


Abb. 63 Totalionenstrom-Chromatogramm von *Phaeobacter inhibens* DSM17395 Wildtyp mit bekannten volatilen Komponenten

In den bisherigen Untersuchungen von *P. inhibens* in unserer Arbeitsgruppe wurden entweder die flüchtigen Bestandteile mit Hilfe der CLSA-Analytik oder die Homoserinlaktone untersucht. Dabei wurde ausschließlich mit Hilfe von GC/MS analysiert. Ein Nachweis der TDA ist unter gaschromatographischen Bedingungen aufgrund der Polarität des Moleküles nicht möglich. Die Verbindungen, welche im Retentionsbereich von 32 bis 44 Minuten auftreten sind dem Medium zuzuordnen und gehören zur Gruppe der Diketopiperazine.

3.3.2 Antibiotikum

Das Antibiotikum TDA **106** ist sowohl in *Phaeobacter inhibens* wie auch in verschiedenen anderen marinen Bakterien wie *Ruegeria sp.*, *Silicibacter sp.* und *Pseudovibrio sp.* nachgewiesen worden und stellt somit eine besondere Anpassung an die Umwelt des marinen Ökosystems dar.^{[44][91][92]} Dabei handelt es sich um ein Molekül mit einem Tropon-Grundgerüst, welches über eine zusätzliche Säurefunktion und eine Disulfidbrücke verfügt (Abb. 64). TDA wird dabei aber nicht selbst aus Tropon umgewandelt, sondern sowohl Tropon als auch die Tropodithiätsäure (**106**) werden über den zentralen Phenyllessigsäuremethylester Abbauweg hergestellt.^[93]

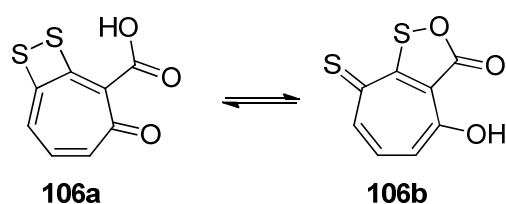


Abb. 64 Tautomere Strukturen von TDA^[90]

Weitere Untersuchungen von TDA-produzierenden Stämmen zeigten, dass fast alle diese Bakterien auch AHLs produzieren. *Phaeobacter* 27-4 und *Phaeobacter inhibens* produzieren 3-OH-C10-AHL **107**, nur *Silicibacter* sp. TM1040 zeigt bei Metabolitenuntersuchungen keine typischen AHLs.^{[94][95]} Bei dem hier untersuchten antibiotikaproduzierenden Bakterium *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 wurden Quorum-Sensing Gene (*rail* und *railR*) gefunden, die denen aus dem Bakterium *Rhizonium etli* homolog waren. So sollen die hier aufgeführten Untersuchungen zeigen, dass eben dieses *rail* Gen essentiell für die Produktion von 3-OH-C10AHL und beide Gene zusammen für die Produktion von TDA unerlässlich sind.^[96]

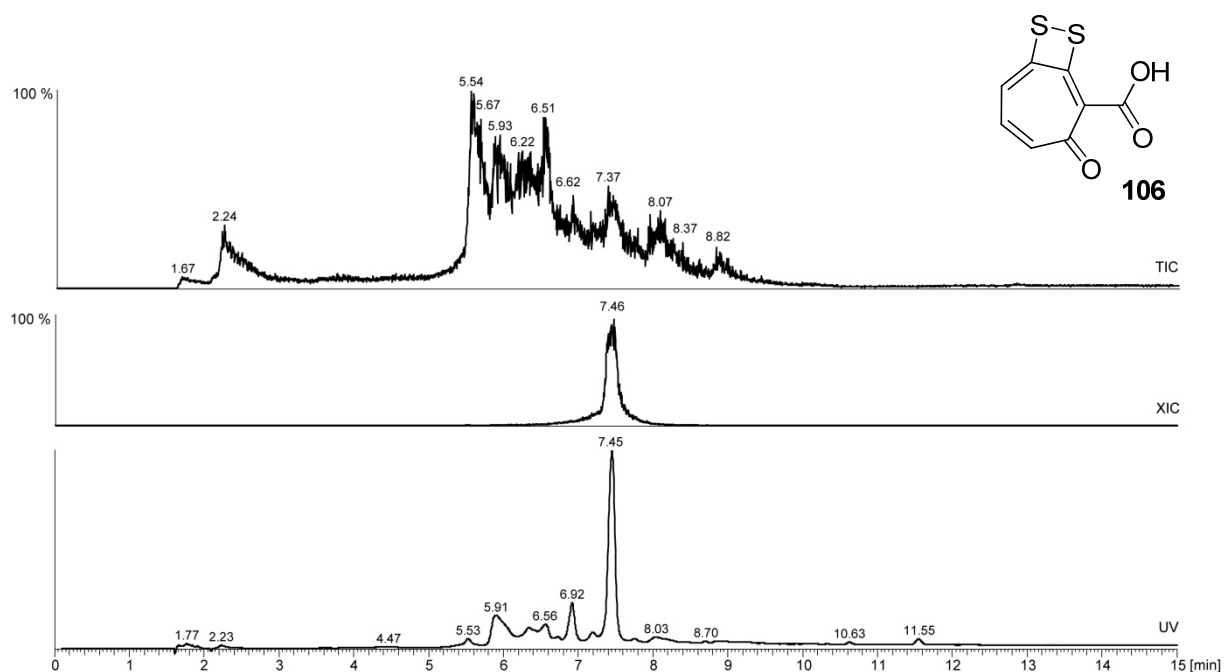


Abb. 65 Ionenchromatogramm (HPLC-MS) von *Phaeobacter inhibens* DSM17395 Wildtyp mit ESI negativ (Oben), Massespur von TDA (Mitte), UV Chromatogramm (unten)

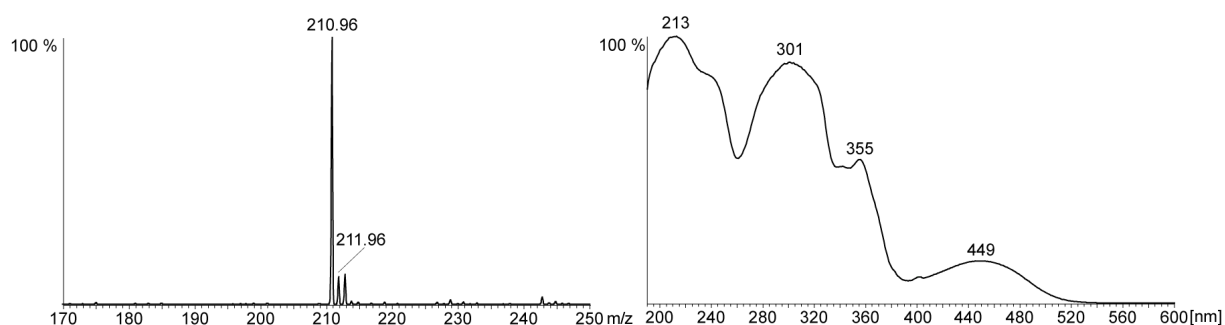


Abb. 66 ESI negatives Massenspektrum der TDA vermessen mit ESI negativ und UV Spektrum der TDA

Der Nachweis von TDA erfolgte nicht mittels GC/MS, sondern über HPLC/MS. Dabei zeigte sich, dass eine negative Ionisation aufgrund der freien Säuregruppe am effektivsten ist, das Molekül zu detektieren. Das Antibiotika mit der Molmasse von 212 g/mol zeigt die hierfür zu erwartende Masse $[M-H]^- = 211$ auf. Außerdem ionisieren bei negativer Spannung deutlich weniger Substanzen, so dass Moleküle mit Säurefunktion deutlich aus den Chromatogramm erkennbar sind. Eine Zuordnung der TDA bei positiver Ionisierung ist ausschließlich anhand der sehr intensiven und charakteristischen UV Absorption bei 7.45 min möglich.

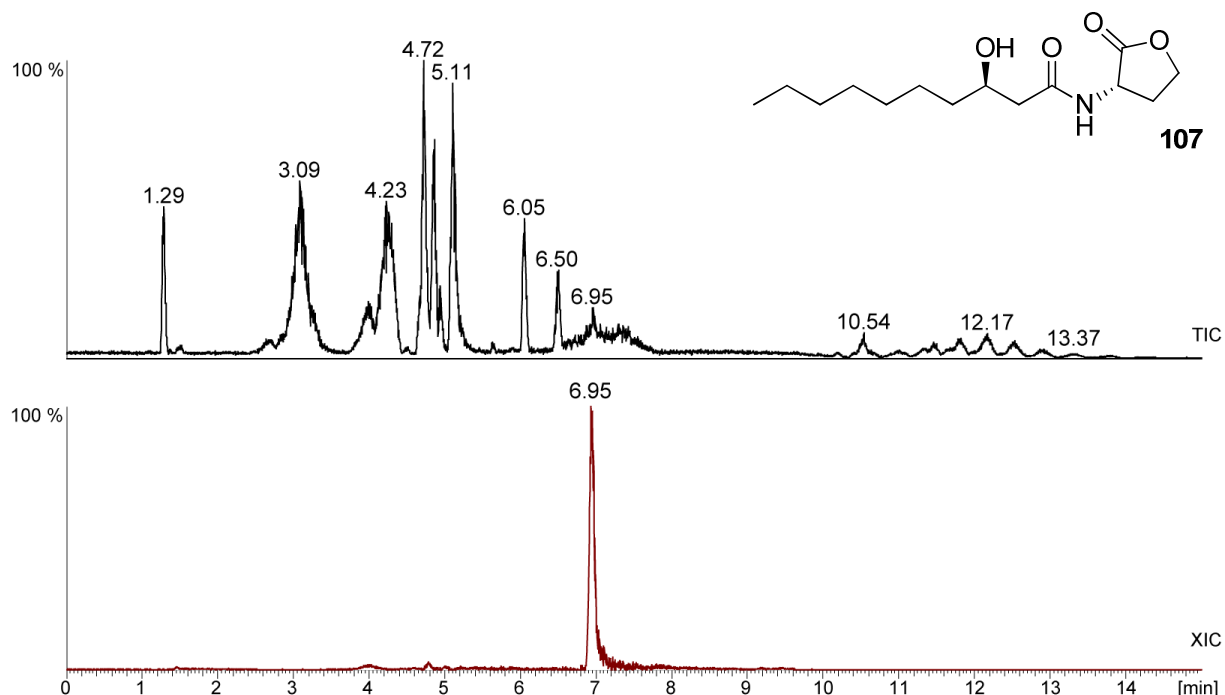


Abb. 67 HPLC-Chromatogramm von *Phaeobacter inhibens* DSM17395 Wildtyp mit positiver ESI Ionisierung (oben), Massespur von 3-OH-C10AHL **107** (unten)

Genau umgekehrt verhält es sich mit der Ionisation von 3-OH-C10AHL **107**, welches unter ESI negativen Bedingungen ein deutlich schwächeres Signal aufweist als mit positiver Ionisation. Dazu ergibt sich das Problem, dass die AHLs kein charakteristisches UV Maximum aufweisen, so dass der Nachweis dieser Verbindungen nur ausschließlich mittels der Masse und der Fragmentierung bei MS-MS-Untersuchungen erfolgen kann. Außerdem ist anhand der Totalionenstromchromatogramme gut zu erkennen, dass bei negativer Ionisation deutlich weniger Moleküle detektiert werden als mit positiver Ionisation. Das führt bei so komplexen Extrakten zu dem Problem von Überlagerungen, wodurch die Identifizierung von Verbindungen deutlich erschwert wird. In dem Fall der 3-OH-C10-AHL ist aber anhand der Massespur auf $m/z = 272$ der Autoinducer sehr gut zu erkennen.

3.3.3 Signalmoleküle

Das Bakterium *Phaeobacter inhibens* DSM17395 ist bekannt das Signalmolekül (*R*)-3-OH-C10-AHL **107** zu produzieren, dessen Struktur wurde dabei ebenfalls im Arbeitskreis SCHULZ aufgeklärt.^[64] Die Funktion und Bedeutung dieses AHLs blieb allerdings ungeklärt. Dabei wurde in Kooperation mit dem ICBM Oldenburg aus der Arbeitsgruppe um M. SIMON und T. BRINKHOFF die Vermutung aufgestellt, dass das 3-OH-C10-AHL die Synthese des Antibiotikums TDA reguliert. Deshalb wurden zwei Mutanten erzeugt, welche zum Einem nicht mehr in der Lage sind das AHL zu synthetisieren ($\Delta rail$) und zum Anderem eine Mutante, welche kein Regulator für das AHL besitzt ($\Delta railR$). Ziel der Untersuchung war festzustellen inwieweit die Produktion des von TDA in den Mutanten beeinträchtigt ist. Die Detektion des AHLs erfolgte dabei mit GC/MS, wobei die charakteristische Fragmentierung die Identifizierung des Moleküls im Naturextrakt deutlich begünstigt. Neben den normalerweise auftretenden Fragmenten $m/z = 102$ und $m/z = 143$ tritt hier ein weiteres wichtiges Fragment mit $m/z = 172$ auf. Dies entsteht durch α -Spaltung der Bindung neben der Hydroxyfunktion.

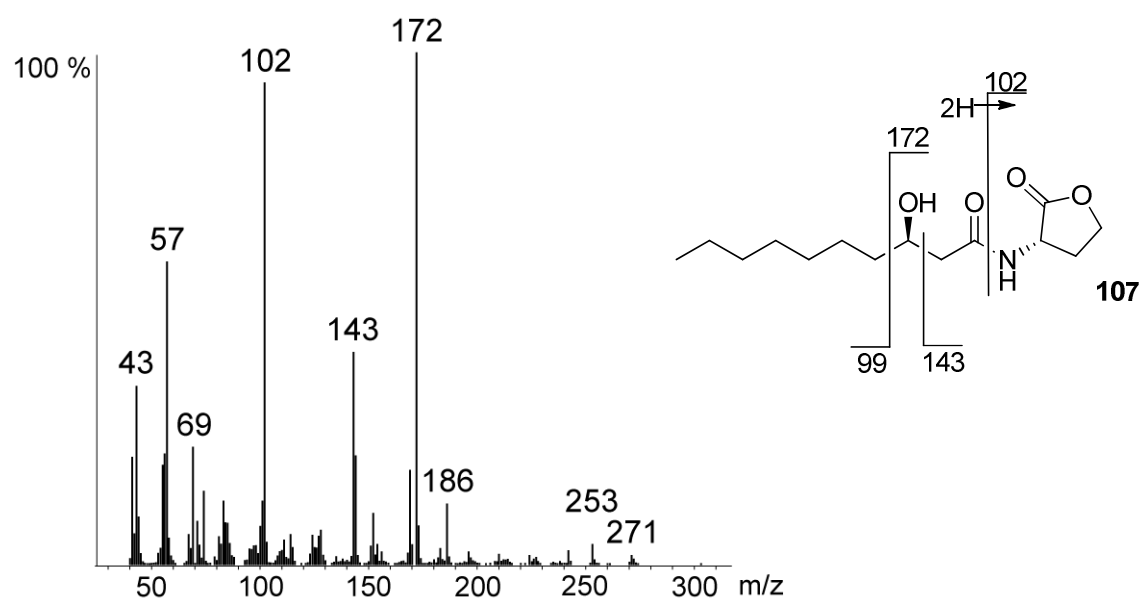


Abb. 68 Massenspektrum von 3-Hydroxydecanoylhomoserinlaktone (**107**)

3.3.4 Biosynthese des Antibiotikums

Für die Biosynthese ausgehend von Phenylalanin (**108**) sind insgesamt 12 Gene identifiziert worden. Dabei gibt es sechs essentielle *tdaA-F* Gene und sechs weitere Gene des primären Metabolismus (*cysI*, *malY*, *paaIJK* und *tdaH*). Die Identifizierung der Gene erfolgte anhand von *Silicibacter* sp. TM1040.^{[93][92][91][90][89][88][87][94]}

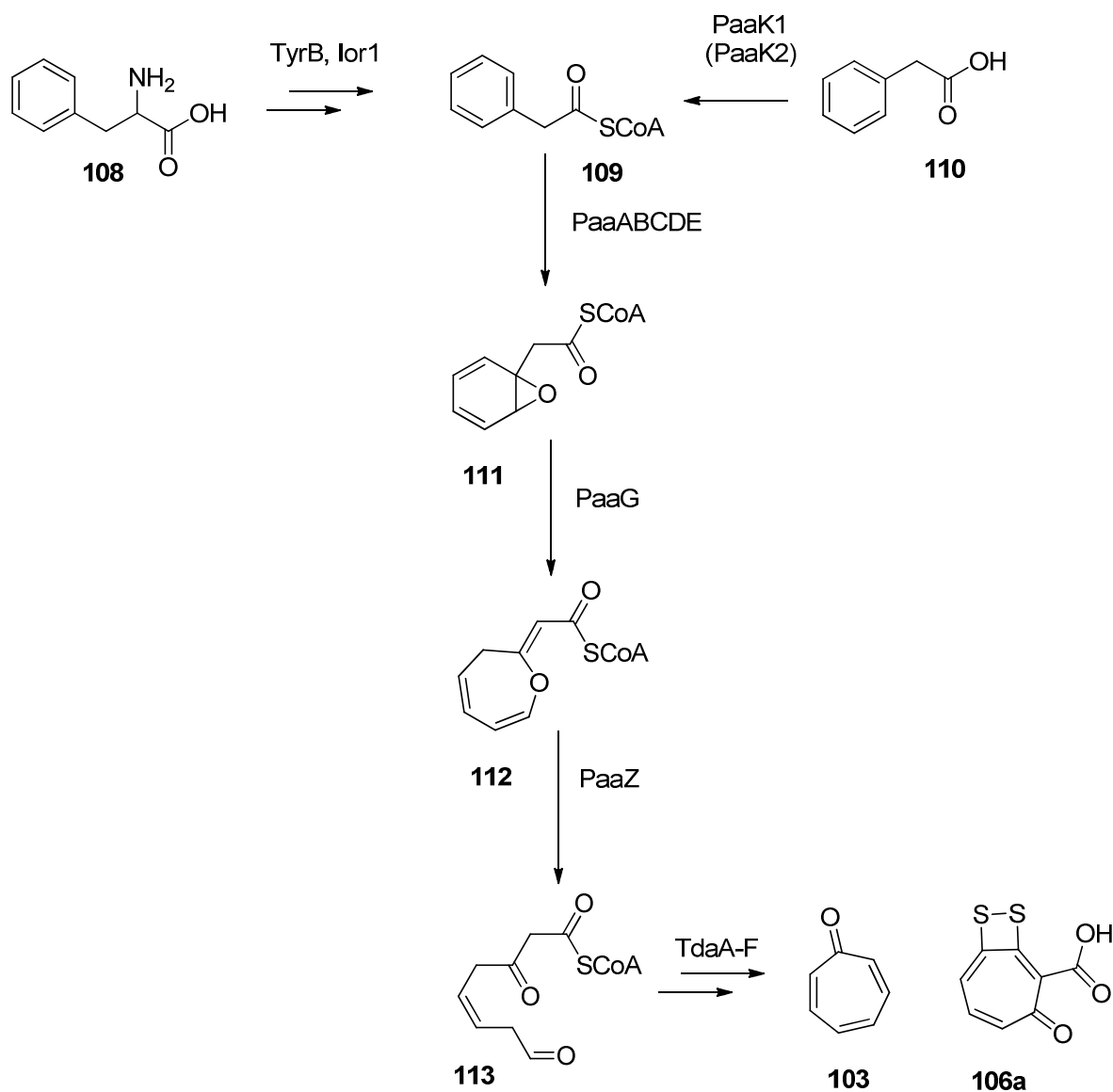


Abb. 69 Biosynthese Schema der TDA **106** und Tropon (**103**)^[93]

Wie anhand des Biosynthese Schemas (Abb. 69) verdeutlicht wird, stellt Phenylalanin (**108**) nicht den einzigen Ausgangsstoff dar.^[90] In aktuellen Untersuchungen wurde der vorherige Biosyntheseweg angepasst, so dass die entscheidende Zwischenstufe Phenylacetyl-CoEnzymA **109** auch durch Umsetzung von Phenylelessigsäure (**110**) zugänglich ist. Untersuchungen von knockout Mutanten haben gezeigt, dass ein Verlust des *ior1* Genes die Synthese der TDA um 60 % verringert, ein Fehlen des *paaK1* bzw. des *paaK2* Genes aber zu keiner Produktion von TDA führt. Die Oxidation des Ringes wird durch die *paaABCDE* Gene kodierte Oxygenase durchgeführt. Durch weitere Reaktionen sind schließlich die beiden Produkte Tropon (**103**) und Tropodithiätsäure (**106**) zugänglich.

Inwieweit das Ausschalten der Quorum-Sensing Gene *raiR* und *rail* die Produktion dieser beiden Verbindungen beeinflusst, soll im Folgenden untersucht werden.

3.3.5 Zusammenhang zwischen Autoinducer und Antibiotikum

Phaeobacter inhibens DSM17395 und die beiden Mutanten WP38 ($\Delta rail$) und WP52 ($\Delta raiR$) wurden in Marine Broth Medium mit zwei Gewichtsprozent XAD-16 über 21 h bei 28 °C kultiviert. Anschließend wurde das XAD filtriert und mit Dichlormethan gewaschen. Die Kulturlösung wurde zusätzlich ebenfalls mit DCM/Wasser im Verhältnis 1:1 extrahiert. Die organische Fraktion wurde eingeeengt und mittels GC/MS analysiert.

PCR Untersuchungen von *Phaeobacter inhibens* DSM17395 zeigten bei den Untersuchungen der Transkription der TDA Gene, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen *tdaA* und den *raiR* und *rail* Genen gibt. Zudem gibt es einen direkten Zusammenhang zwischen TDA Synthese und dem braunen Pigment, welches durch die intensive Färbung ein direkter Indikator für die Produktion des Antibiotikums ist.

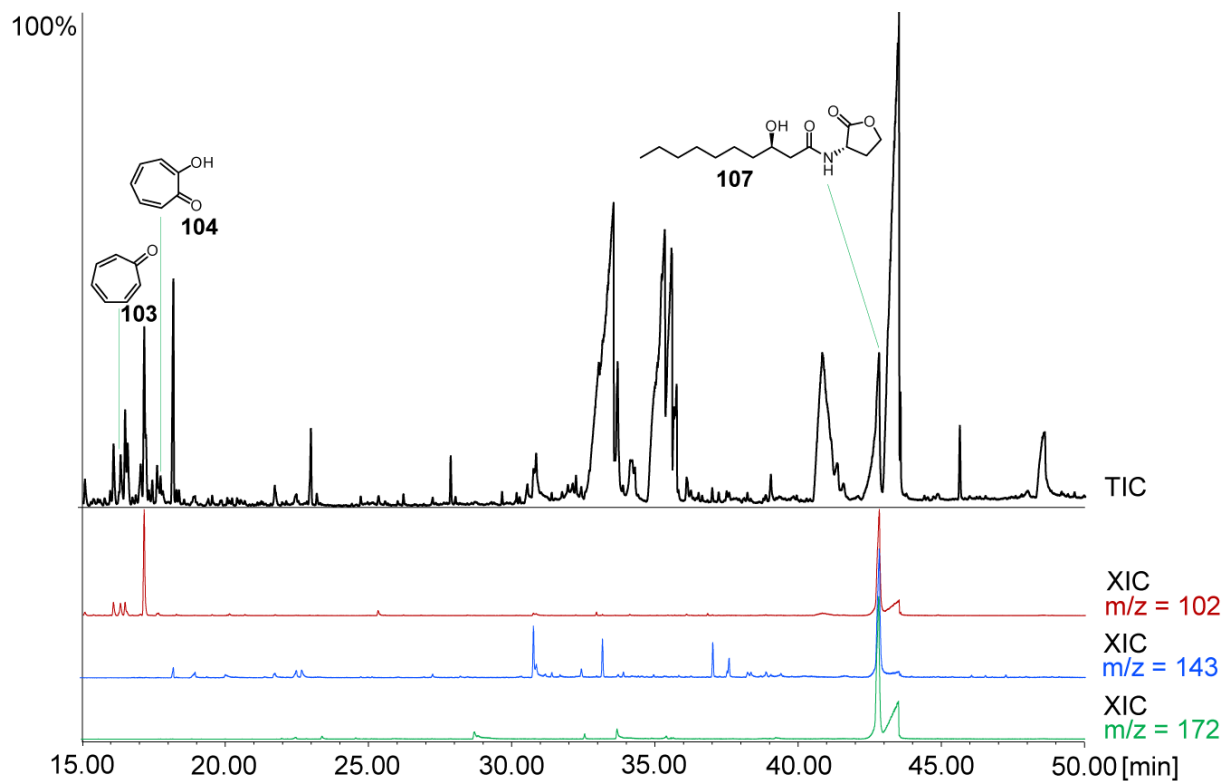


Abb. 70 GC/MS Chromatogramm des *Phaeobacter inhibens* DSM17395 Wildtyp Extraktes (XAD) inklusiver charakteristischer Ionenspuren für 3-OH-C10-AHL **107**

Untersuchungen mittels GC/MS haben im *P. inhibens* DSM17395 neben den beiden Verbindungen Tropon (**103**) und Tropolon (**104**) ebenfalls das Signalmolekül 3-OH-C10-AHL **107** nachgewiesen (Abb. 70). Da das AHL mit Medienbestandteilen koeluiert, wird die Komponente anhand ihre drei typischen Fragment-Ionen $m/z = 102$, 143 und 172 detektiert. Als weiteres Identifizierungskriterium ist die Retentionszeit entscheidend.

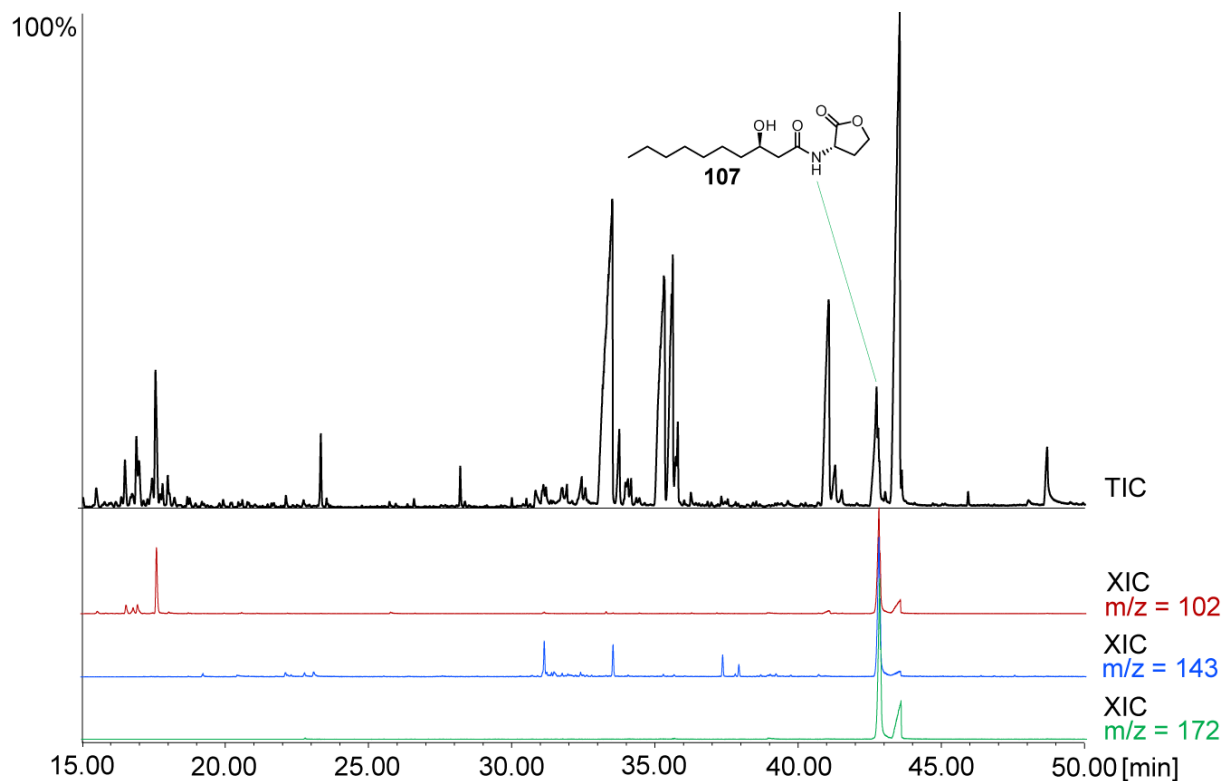


Abb. 71 GC/MS Chromatogramm der *Phaeobacter inhibens* DSM17395 *raiR* Mutante (XAD)

Nachfolgend wurde die Mutante *P. inhibens* WP52 mit dem abgeschalteten Rezeptor-Protein analysiert (Abb. 71). Die AHL Synthase ist weiterhin aktiv, da mittels GC/MS der Autoinducer zweifelsfrei nachgewiesen wurde. Dies wurde anhand der charakteristischen Fragment-Ionen belegt. Ein Nachweis von Tropon oder Tropolon war allerdings nicht möglich. Offenbar wird zwar der Autoinducer produziert, doch die TDA-Biosynthese wird aufgrund des fehlenden AHL-Rezeptor-Komplexes nicht angeschaltet.

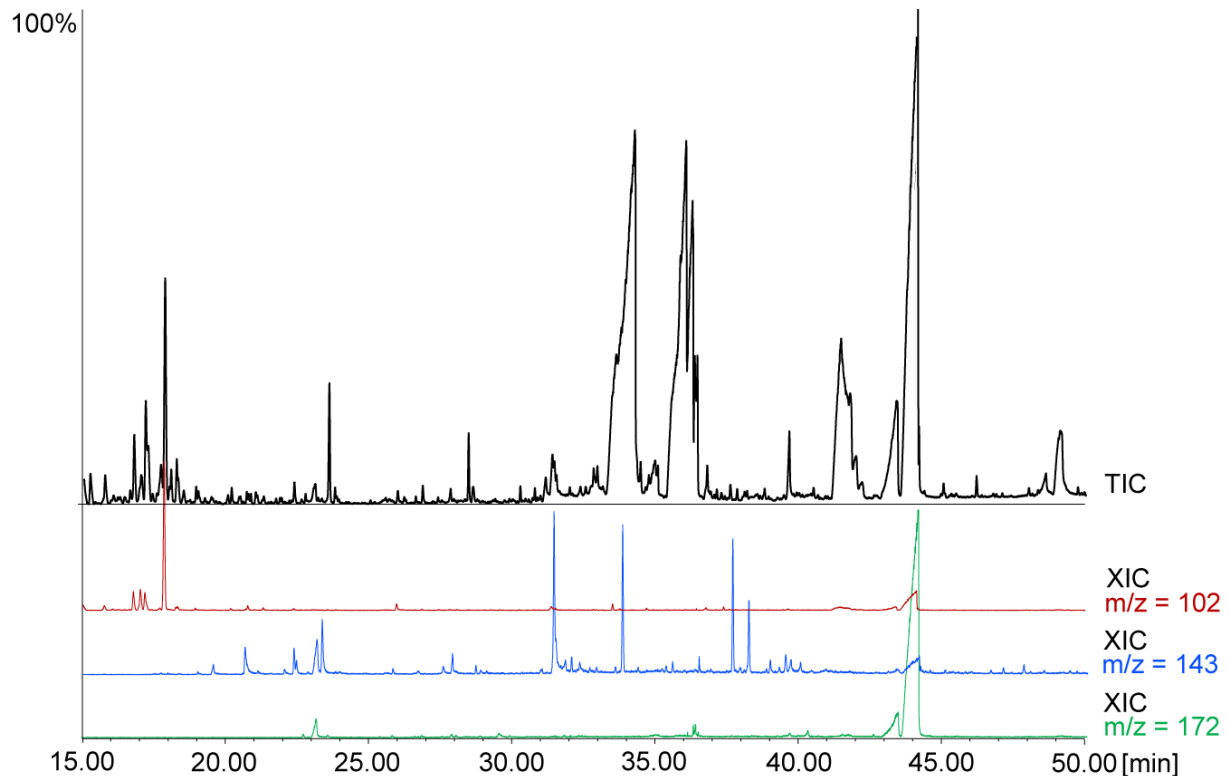


Abb. 72 GC/MS Chromatogramm der *Phaeobacter inhibens* DSM17395 *rail* Mutante

Die anschließende Analyse des Extraktes der *rail* Mutante *P. inhibens* WP38 zeigte im GC/MS Chromatogramm keine Übereinstimmung der Fragment-Ionen bei der erwarteten Retentionszeit (Abb. 72). Somit ist diese Mutante nicht in der Lage das AHL zu produzieren. Tropon und Tropolon konnten auch in dieser Mutante nicht nachgewiesen werden, so dass die TDA-Biosynthese nicht wahrscheinlich ist.

Die Ergebnisse zeigen wie vermutet, dass sowohl der Wildtyp als auch die *raiR*-Mutante 3-Hydroxy-decanoylhomoserinlaktone (**107**) aufweisen, während die *rail* Mutante kein AHL produziert. Somit zeigt sich, dass die *raiR* Gene nicht essentiell für die Produktion des Signalstoffes ist, wobei das *rail* Gen eben diese Produktion kodiert. In beiden Mutanten konnte kein TDA nachgewiesen werden. Zudem konnte beobachtet werden, dass beide Mutanten kein braunes Pigment produzierten.

Durch Zugabe von synthetischen 3-OH-C10AHL **107** zu *Phaeobacter inhibens* DSM17395 WP38 konnte abhängig von der zugegeben Konzentration sowohl die Produktion des

Pigments und Antibiotikums als auch der Phänotyp wiederhergestellt werden. Durch Zugabe anderer Signalmoleküle konnte die Produktion der TDA nicht wiederhergestellt werden. Interessanterweise konnte die Pigment- und Antibiotikaproduktion ebenfalls durch eine Zugabe von 1 μ M reiner TDA Lösung wiederhergestellt werden, wenngleich die Konzentration um etwa das 2000fach höher sein muss, um diesen Effekt zu erreichen, als die Zugabe des Signalmoleküles.

Die Bedeutung der *raiR* Mutante für die Produktion von TDA wurde durch die Zugabe des zuvor entfernten Gens auf einem Plasmid belegt. Dadurch konnte der Phänotyp wiederhergestellt und die antibiotische Aktivität zurückgewonnen werden. Eine Zugabe des Antibiotikums zu *Phaeobacter inhibens* DSM17395 WP52 konnte den Phänotyp nicht wiederherstellen, wie dies bei der WP38 Mutante der Fall war. Dies deutet darauf hin, dass sowohl das AHL als auch die TDA an das RaiR Protein binden können und somit die Expression der *tdaA* Gene aktivieren können.

Die aus den beiden Mutanten gewonnen Erkenntnisse lassen den Schluss zu, dass die Produktion der TDA quorum sensing gesteuert ist. Keine der beiden Mutanten selbst ist in der Lage das Antibiotikum zu produzieren. Um den Zusammenhang zwischen den *rail* und *raiR* mit den *tda* Genen zu bestimmen, wurden sich der qRT-PCR Methode bedient. So zeigte die *raiR* Mutante eine Herunterregulierung der *tdaA*, *tdaB*, *tdaF* und *paaN2* Gene, wobei die Expression des *tdaA* Gens um den Faktor 51 herunterreguliert wurde. Somit ist das *tdaA* Gen deutlich durch das *raiR* Gen beeinflusst. Durch das Ausschalten des *tdaA* Genes konnte durch qRT-PCR gezeigt werden, dass es zu keiner Expression der *tdaB*, *tdaE* und *tdaF* Gene kommt. Somit beeinflusst das *raiR* Gen direkt die Transkription anderer TDA Gene. Die *rail* Mutante zeigte ebenfalls einen deregulierenden Effekt auf das *tdaA* Gen um den Faktor 18. Durch Zugabe von 3-OH-C10AHL **107** oder TDA **106** konnte das Transkriptionslevel von *tdaA* auf Wildtyp Niveau wiederhergestellt werden.^{[94][96]}

3.4 Identifizierung mittels GC/MS und HPLC/MS von extrazellulären Metaboliten der *Roseobacter* Gruppe

Die Identifizierung der Sekundärmetabolite und Signalmoleküle aus den Roseobakterien erfolgte bisher in der Arbeitsgruppe mittels GC/MS. Daneben sollte gezeigt werden, dass mit HPLC/MS sich ebenfalls Möglichkeiten ergeben, bestimmte Verbindungen nachzuweisen.^[97] Eine Bestimmung durch die Ermittlung der exakten Masse und die daraus resultierende Summenformel wäre die einfachste Möglichkeit unbekannte Moleküle zu erkennen und zuzuordnen. Aufgrund der Einschränkung, keine hochaufgelöste Masse messen zu können, wurden analog zu den Fragmentierungen im GC/MS die charakteristischen Fragmentierungen im ESI-MS untersucht. Dabei sind zum Einem die Fragmentierung bei positiver aber auch der negativer Ionisierung zu berücksichtigen. Die Ergebnisse sollen hier im Folgenden aufgezeigt werden.

3.4.1 Fragmentierung in GC/MS

Die Vorteile dieser Methode sind die gute chromatographische Auftrennung und die Fragmentierung der Moleküle mittels EI-MS, welches mithilfe von Datenbanken wie NIST zu einer effizienten Verifizierung der Struktur führen kann. Zusätzlich ist der Vergleich der Retentionsdaten sehr wichtig. Selbst aus der Kenntnis von bestimmten Fragmentierungen lassen sich Strukturvorschläge analog zu bereits bekannten Verbindungen machen (Abb. 73). Dies wird bei der Identifizierung neuer Signalmoleküle ausgenutzt.

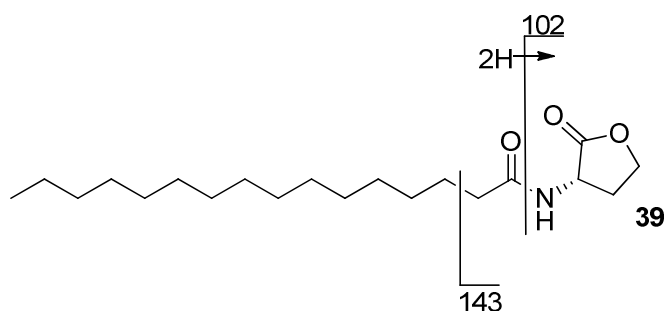


Abb. 73 Allgemeines Fragmentierungsschema von AHLs unter EI-MS Bedingungen

Charakteristisch sind die Fragmente $m/z = 102$ und $m/z = 143$, welche durch die Spaltung der Amid-Bindung und durch eine McLafferty Umlagerung zustande kommen (Abb. 74).

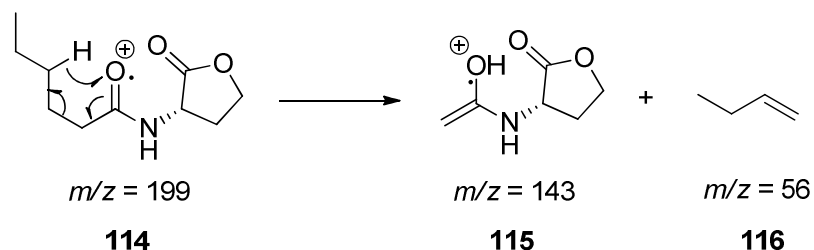


Abb. 74 Mechanismus der McLafferty Umlagerung am Beispiel von C6-AHL **114**

Die α -Spaltung neben der Carbonyl-Funktion, welche zu einem Fragment mit $m/z = 128$ führen würde, ist nicht zu beobachten. Durch weitere Fragmente lassen sich zusätzliche Aussagen über eine mögliche Oxidation in 3-Position treffen. So zeigen AHLs ohne eine weitere Oxidation das typische Fragment $m/z = 156$. Häufig ist diese Fragmentierung nur schwach zu beobachten.

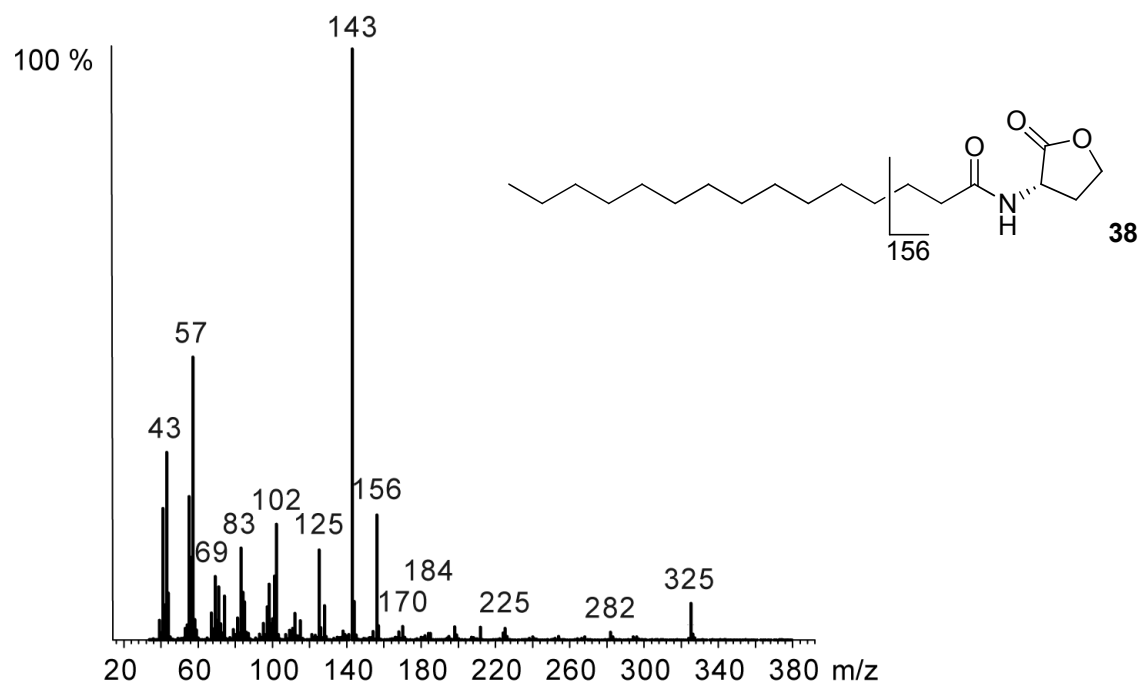


Abb. 75 EI-MS Fragmentierung am Beispiel von C15-AHL **38**

Treten Oxidationen an der 3-Position auf, so ergeben sich neue Fragmente, wie im Falle einer Hydroxy-Funktion mit $m/z = 172$. Dabei wird diese Fragmentierung zu der charakteristischen Fragmentierung im EI-MS Spektrum. Zusätzlich wird das Fragment $m/z = 186$ erhalten, welches sich durch eine β -Spaltung erklären lässt.

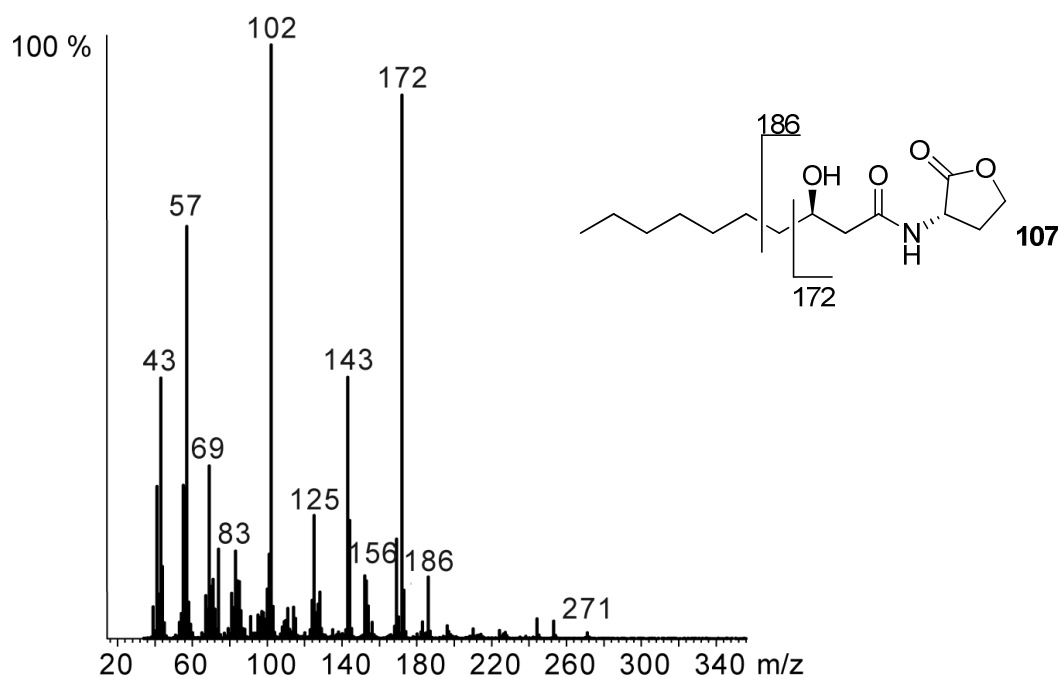


Abb. 78 EI-MS Fragmentierung am Beispiel von 3-OH-C10-AHL **107**

Aber auch das 3-Oxo-AHL **14** lässt sich anhand von EI-MS Fragmentierungen identifizieren. So werden neben den erwarteten Fragmenten auch eine Fragmentierung mit $m/z = 170$ und $m/z = 185$ erhalten. Diese entstehen durch α - und einer weiteren McLafferty Umlagerung, allerdings sinkt hier die Intensität der Spaltung deutlich ab.

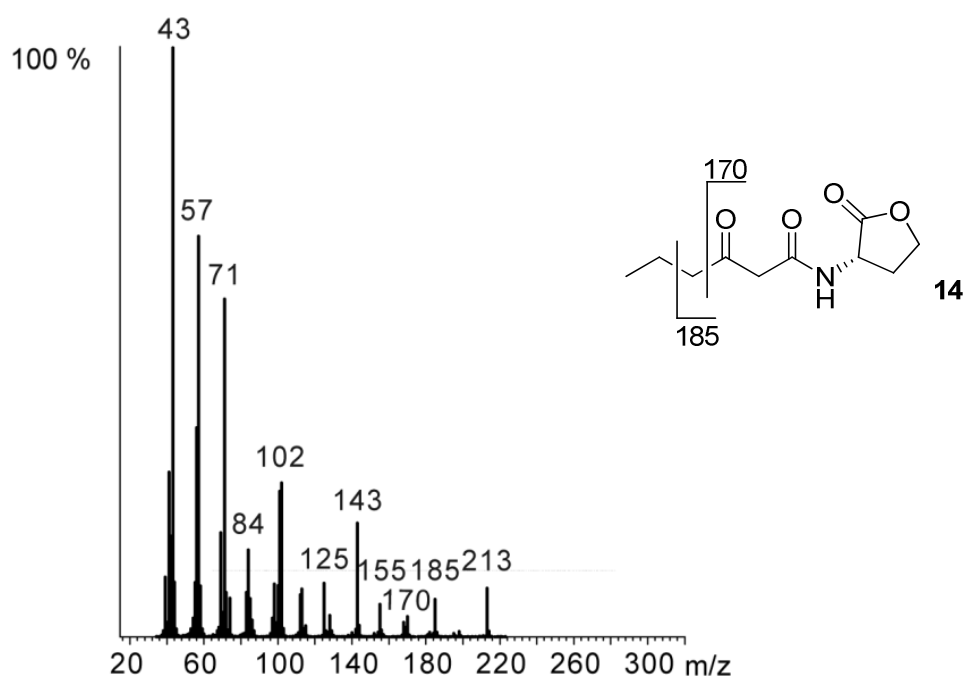


Abb. 79 EI-MS Fragmentierung am Beispiel des 3-Oxo-C6-AHL **14**

3.4.2 Fragmentierung in HPLC/MS

Die Etablierung von Methoden zur Identifizierung von Metaboliten mittels HPLC/MS ist wichtig, da hiermit auch polarere Verbindungen chromatographiert und analysiert werden können, welche mittels GC/MS nicht möglich wären. Allerdings können anhand von ESI-MS-MS Fragmentierungen keine Massenspektren gewonnen werden, welche denen der EI-MS Spektren ähneln. Daher soll hier gezeigt werden, welche Aussage aus den ESI-MS-MS Spektren gewonnen werden kann. Schwerpunkt dieser Untersuchungen ist eine mögliche alternative Detektionsmöglichkeit von Signalmolekülen neben GC/MS zur Verfügung zu haben. Die Untersuchung des Fragmentierungsverhaltens dieser Verbindungen wurde mittels Infusion einer synthetischen Probe durchgeführt. Dafür wurde das ESI-Spray sowohl positiv als auch negativ ionisiert. Im Folgenden werden nun verschiedenen substituierte AHLs anhand ihrer Fragmentierungen beschrieben, um aus den daraus resultierenden wiederkehrenden Fragmentierungsmustern eine Identifizierung von weiteren bekannten wie auch unbekannten AHLs zu ermöglichen.

3.4.2.1 Fragmentierung von ungesättigten AHLs

Im Folgenden sollen die verschiedenen Fragmentierungsmuster von drei verschiedenlangen AHLs untersucht werden. Das C6-AHL **117** zeigte im ESI positiv eine Masse von $[M+H] = 200.08$ und im ESI negativen eine Masse von $[M-H] = 198$. In der positiver Ionisation zeigten sich im MS-MS drei Fragmentierungen (Abb. 80). Die erste Fragmentierung zeigt eine Abspaltung von $m/z = 18$, was einer Eliminierung von Wasser entspricht. Die zweite Fragmentierung, welche das Fragment-Ion $m/z = 172$ bildet, entsteht formal durch Abspaltung von Kohlenmonoxid. Die dritte Fragmentierung ist die einzige Fragmentierung, welche Rückschlüsse auf die Struktur zulässt. Ein Bindungsbruch am Amid führt dabei zu den Fragmenten $[M+H]-101 = 99$ und $[M+H]-98 = 102$.

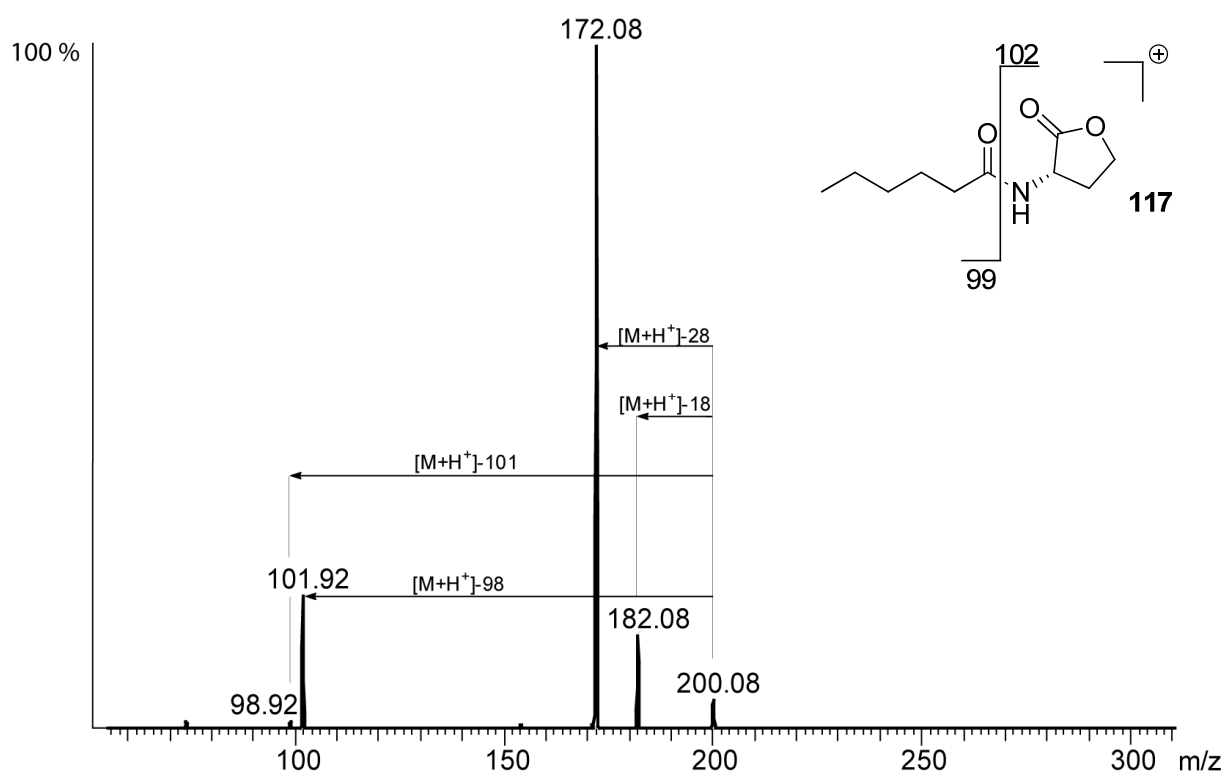


Abb. 80 ESI-MS-MS Massenspektrum von C6-AHL **117** (ESI positiver Modus, Direkt-Injektion, $5 \mu\text{L min}^{-1}$)

Im ESI negativ zeigen sich ebenfalls drei deutliche Fragmentierungen, welche durch die Abspaltung von $m/z = 30$, 44 und 58 gebildet werden (Abb. 81). Eine schwache

Fragmentierung zeigt eine Abspaltung von $m/z = 101$ welches zu dem Fragment-Ion $m/z = 97$ führt. Auch hier handelt es sich um die Spaltung der Amid-Bindung des AHLs. Das Seitenkettenfragment mit $m/z = 99$ für ESI positiv und $m/z = 97$ für ESI negativ sind nur sehr schwach erkennbar.

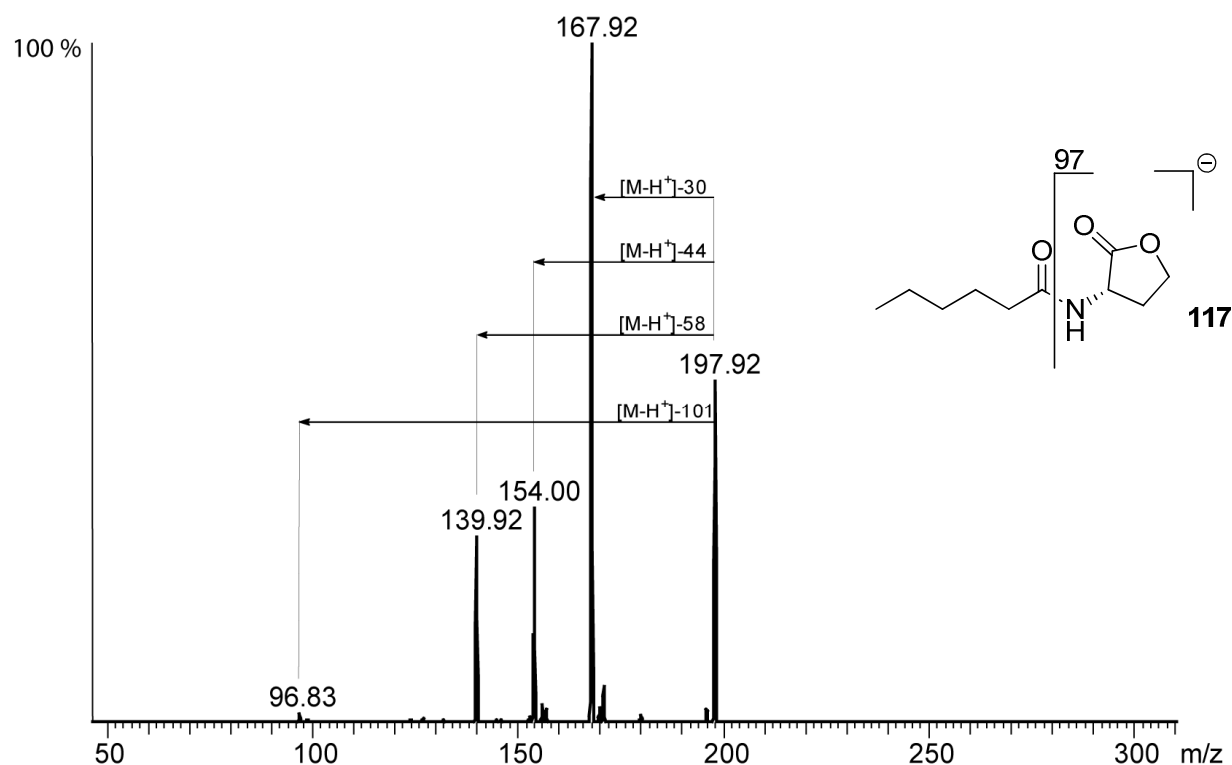


Abb. 81 ESI-MS-MS Massenspektrum von C6-AHL **117** (ESI negativer Modus, Direkt-Injektion, $5 \mu\text{L min}^{-1}$)

Das C14-AHL **34** mit $[M+H]^+ = 312$ zeigt im ESI-MS-MS mit positiver Ionisation fünf Hauptfragmentierungen (Abb. 82). Neben den drei bereits bei dem C6-AHL **117** beschriebenen Abspaltungen von $m/z = 18$ und $m/z = 28$ sowie der Amid-Bindungsspaltung, welches zu dem Fragment-Ion $m/z = 102$ führt, sind hier noch zwei weitere Fragmente zu beobachten. Diese weisen die Masse $m/z = 143$ und $m/z = 211$ auf. Letzteres Fragment entspricht der Seitenkette des AHLs nach dem Amid-Bindungsbruch. Die Masse $m/z = 143$ gleicht der Fragmentierung analog der McLafferty Umlagerung, welche aus dem EI-MS Fragmentierung bekannt ist.

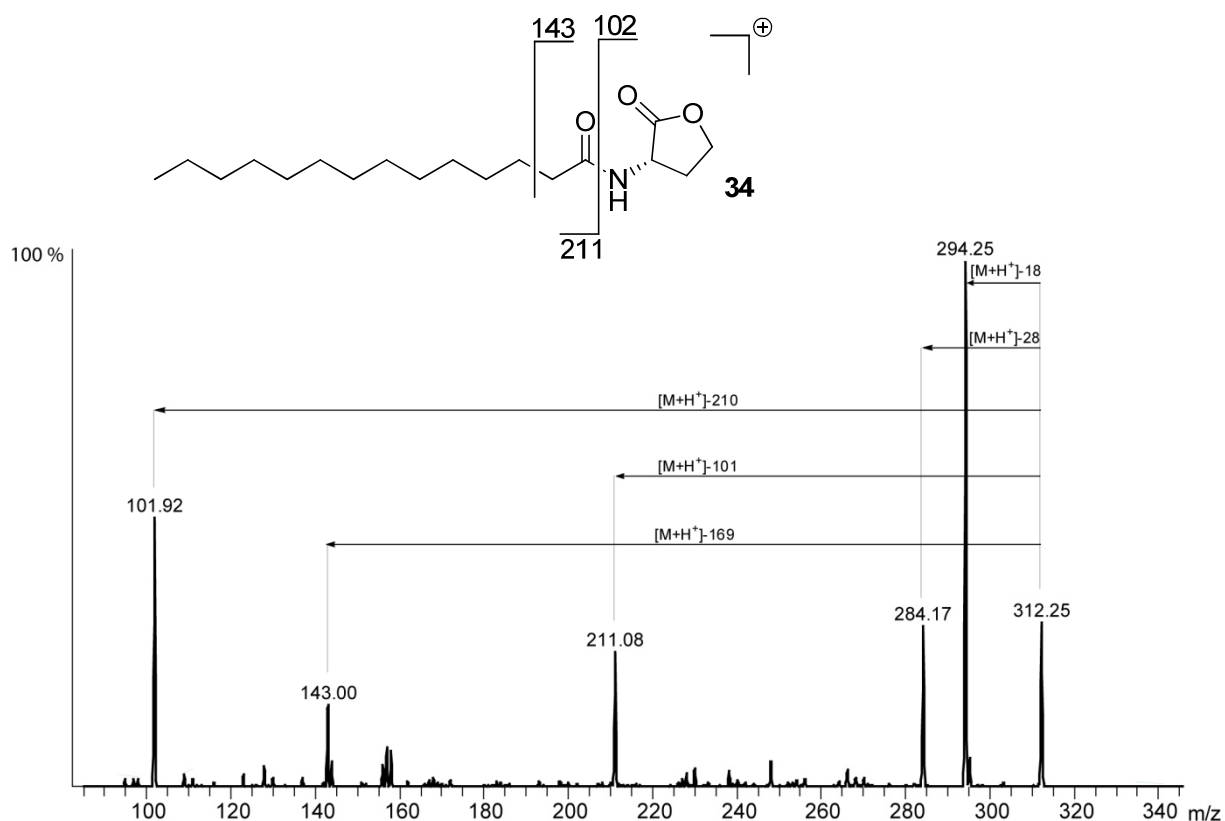


Abb. 82 ESI-MS-MS Massenspektrum von C14-AHL **34** (ESI positiver Modus, Direkt-Injektion, $5 \mu\text{L min}^{-1}$)

Die ESI-MS-MS Fragmentierung mit negativer Ionisierung ist dagegen wenig aussagekräftig (Abb. 83). Zwar sind hier drei Fragmente zu erkennen, allerdings wurden diese uncharakteristisch gebildet. So treten wieder Abspaltungen von $[M-H]^+ - 30 = 280$, $[M-H]^+ - 44 = 266$ und $[M-H]^+ - 58 = 252$ auf.

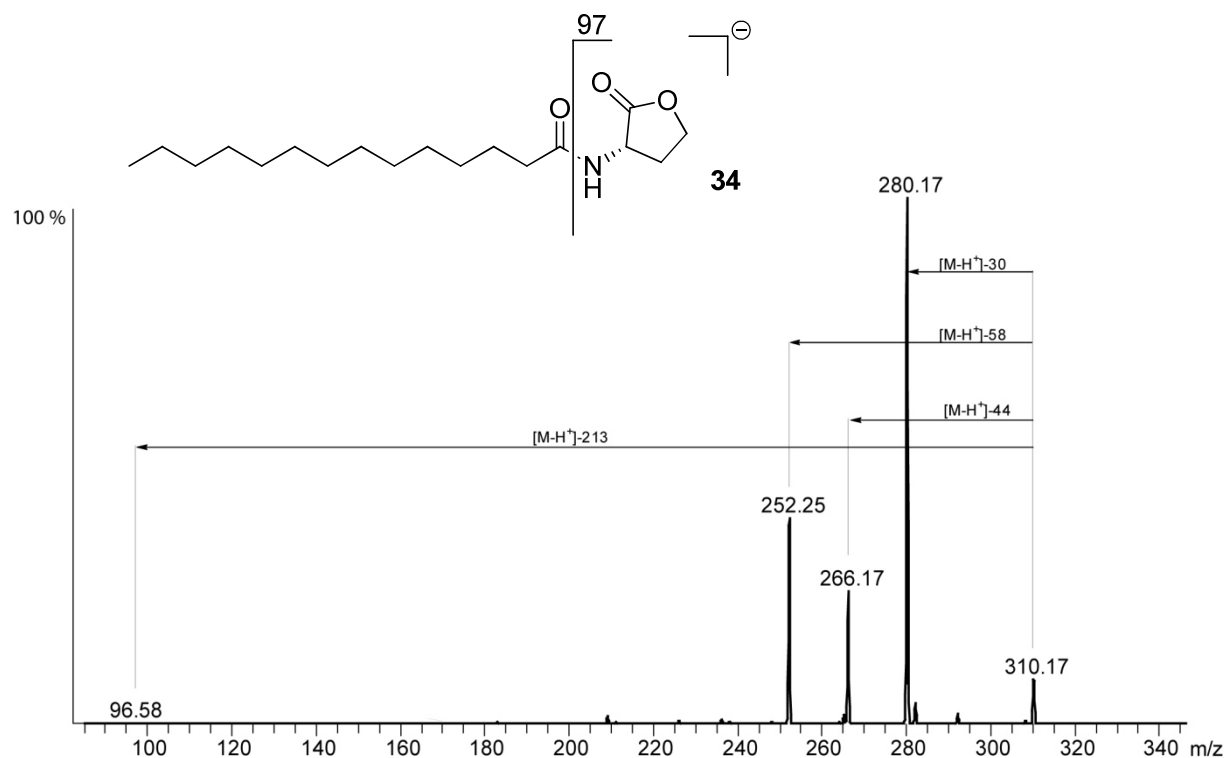


Abb. 83 ESI-MS-MS Massenspektrum von C14-AHL **34** (ESI negativer Modus, Direkt-Injektion, $5 \mu\text{L min}^{-1}$)

Das ESI-MS-MS Massenspektrum von C15-AHL **38** mit $[\text{M}+\text{H}^+] = 326$ zeigt vier Fragmentierungen (Abb. 84). Neben den beiden bereits in den anderen gesättigten AHLs gefundenen Abspaltungen von $m/z = 18$ und $m/z = 28$ tritt auch hier der Amid-Bindungsspaltung auf. Diese führt zu dem Fragment-Ionen $m/z = 102$ und $m/z = 225$, wobei letzteres Fragment der Seitenkette des AHLs entspricht.

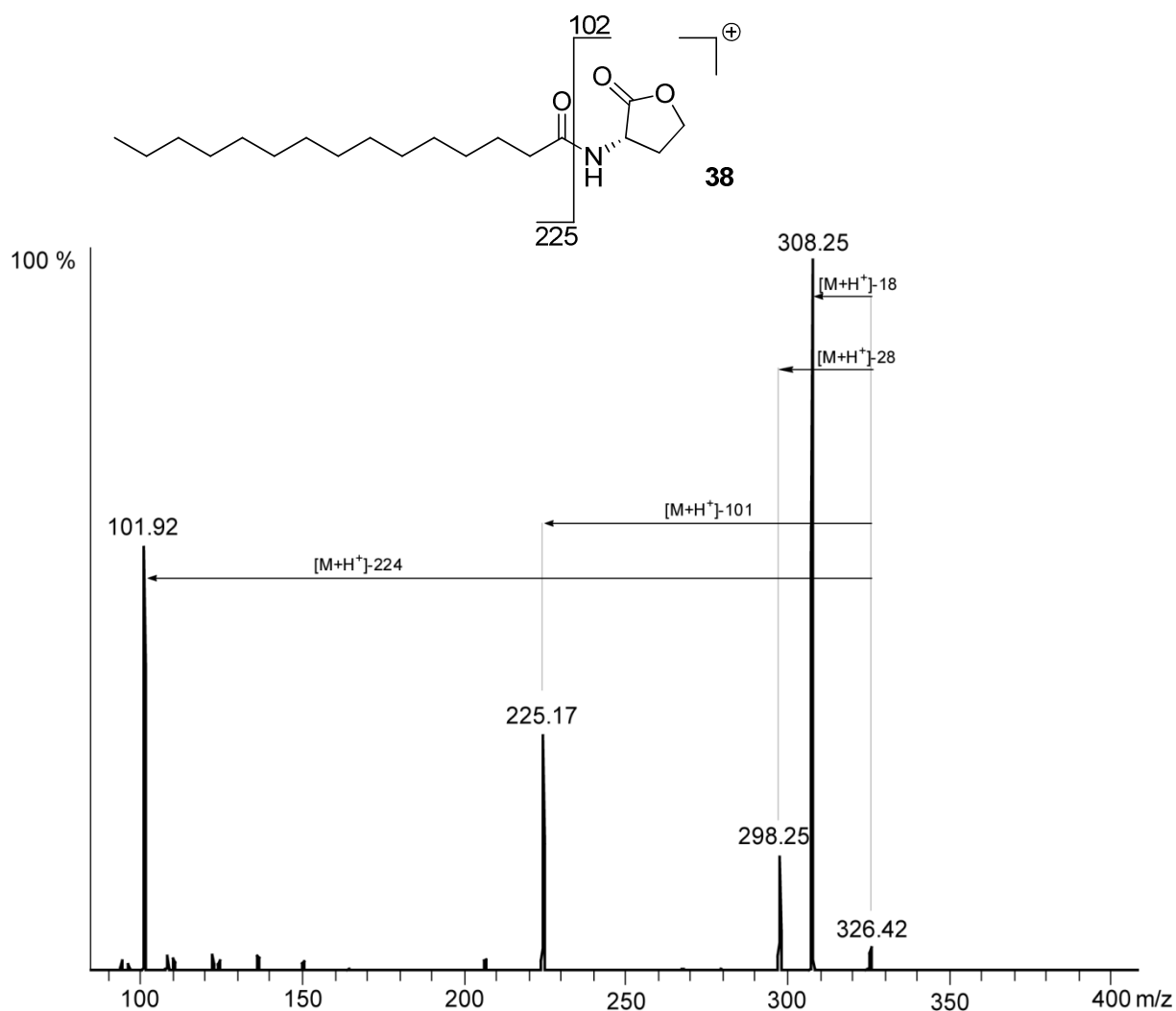


Abb. 84 ESI-MS-MS Massenspektrum von C15-AHL **38** (ESI positiver Modus, Direkt-Injektion, $5 \mu\text{L min}^{-1}$)

Mit negativer Ionisation zeigen sich wiederholt die drei typischen Fragmentierungen, welche durch die Abspaltung von $m/z = 30$, $m/z = 44$ und $m/z = 58$ gebildet werden (Abb. 85). Eine schwache Fragmentierung zeigt eine Abspaltung von $m/z = 101$ welches zu dem Fragment-Ion $m/z = 223$ führt. Auch hier handelt es sich um die Spaltung der Amid-Bindung des AHLs. Im Gegensatz zu der positiven Ionisation ist hier das Seitenkettenfragment nur sehr schwach erkennbar.

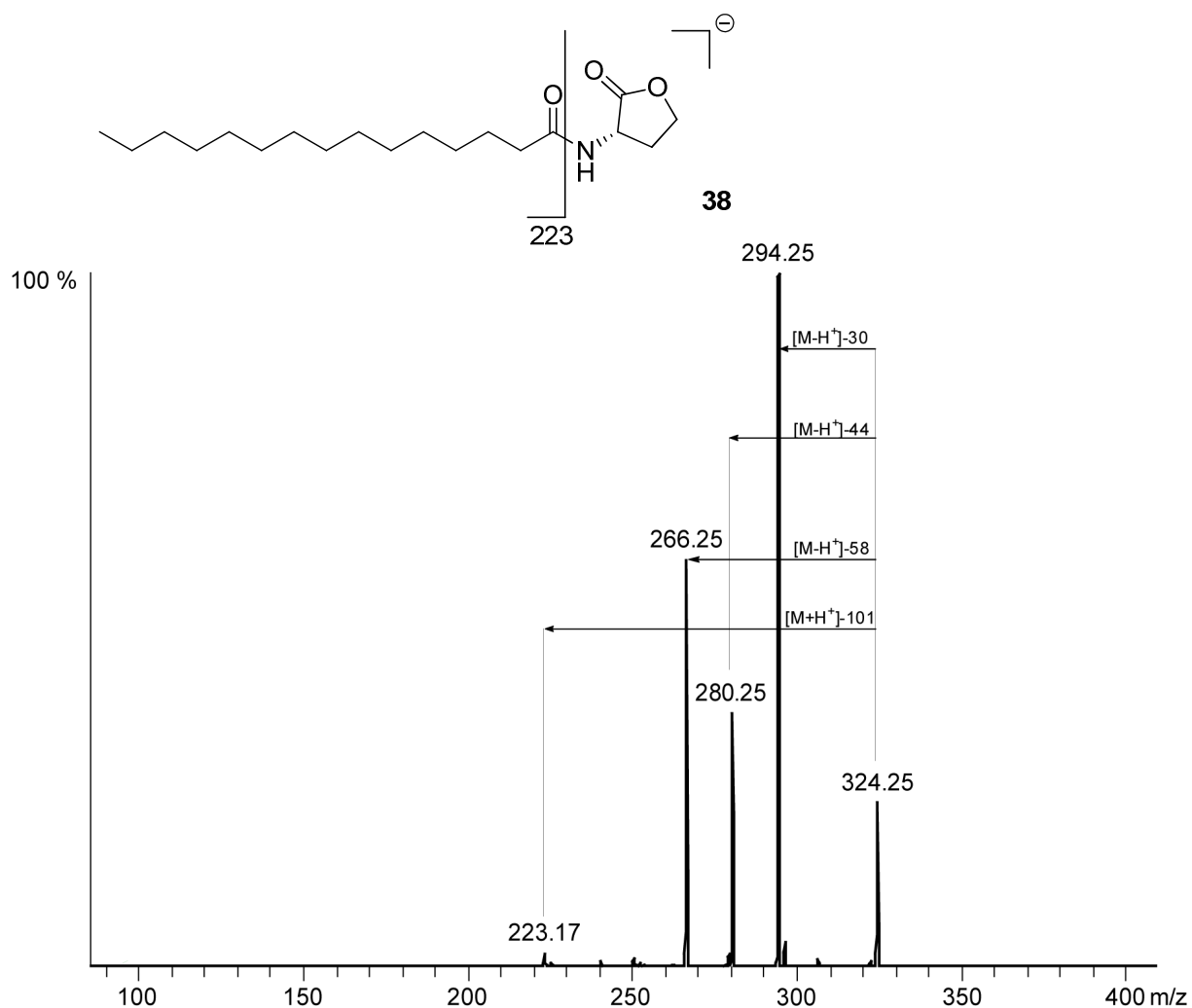


Abb. 85 ESI-MS-MS Massenspektrum von C15-AHL **38** (ESI negativer Modus, Direkt-Injektion, $5 \mu\text{L min}^{-1}$)

3.4.2.2 Fragmentierung von ungesättigten AHLs

Die Fragmentierung der ungesättigten AHLs ist ähnlich derjenigen gesättigten AHLs. Wird die Fragmentierung im ESI positiven von Z-11-C18:1AHL **34** betrachtet, so resultieren die Fragment-Ionen $m/z = 348$ aus dem Verlust von Wasser, $m/z = 338$ durch den formalen Verlust von Kohlenmonoxid und $m/z = 334$ durch die Abspaltung von Formaldehyd (Abb. 86). Die einzige aussagekräftige Fragmentierung wird durch das Ion $m/z = 265$ bestimmt. Hierbei

handelt es sich wieder um die Spaltung der Amid-Bindung und dem daraus resultierenden Seitenkettenfragment. Allerdings ist bei dieser Fragmentierung das Gegenfragment, das geladene Homoserinlaktone mit der Masse 102 nicht zu beobachten. Auch durch die weitere Fragmentierung der ersten Fragment-Ionen lassen sich keine weiteren spezifischen Fragmente identifizieren.

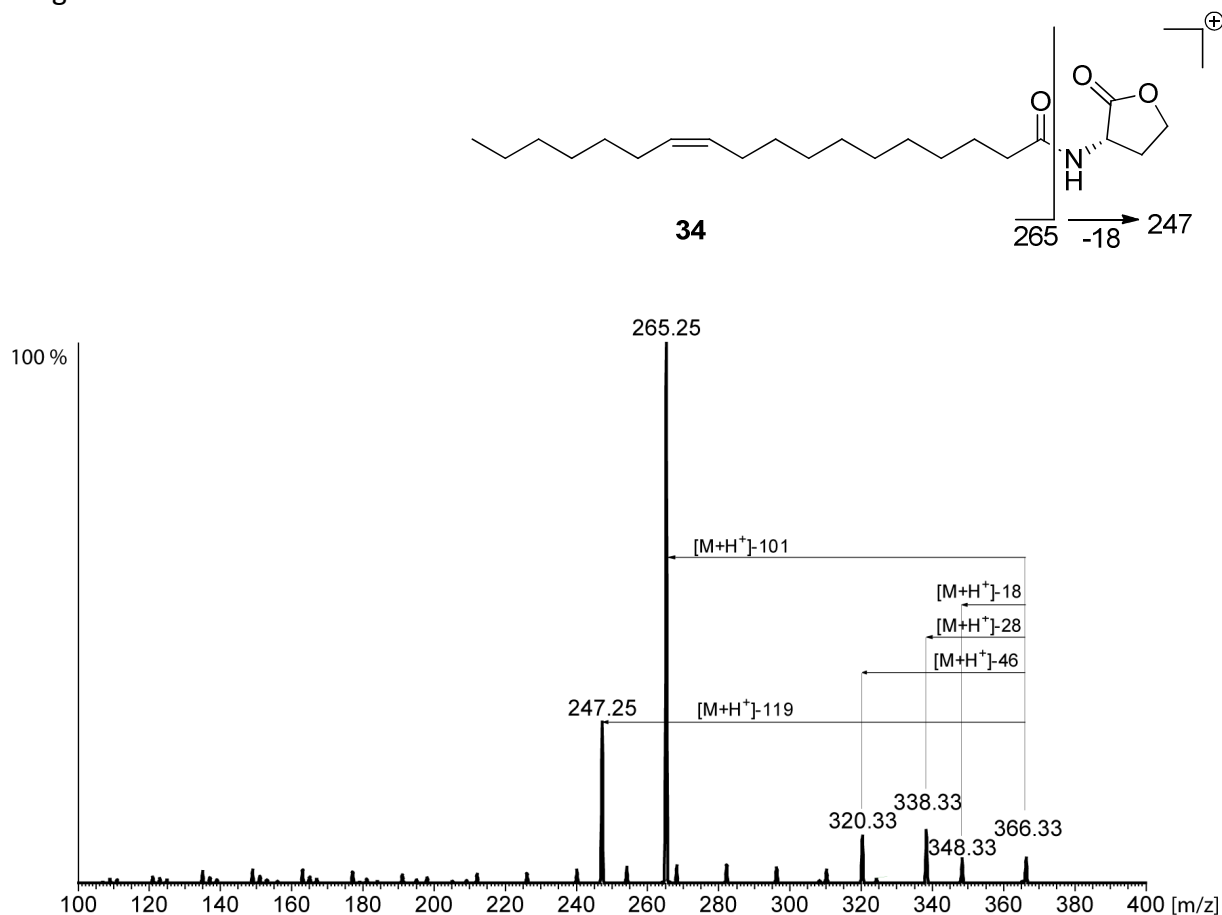


Abb. 86 ESI-MS-MS Massenspektrum von Z-11-C18:1-AHL **34** (ESI positiver Modus, Direkt-Injektion, 5 $\mu\text{L min}^{-1}$)

Bei negativer Ionisation zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei den gesättigten AHLs (Abb. 87). Auch hier treten wieder dieselben Abspaltungen mit [M-H]⁺-30, [M-H]⁺-40 und [M-H]⁺-58 auf. Die einzige charakteristische Fragmentierung zeigt sich durch die Abspaltung von [M-H]⁺-101, welche durch den Bindungsbruch am Amid resultiert und zu dem Fragment-Ion $m/z = 263$ führt. Insbesondere ist eine Bestimmung der Lage der Doppelbindung auch durch MSⁿ-Experimente nicht möglich.

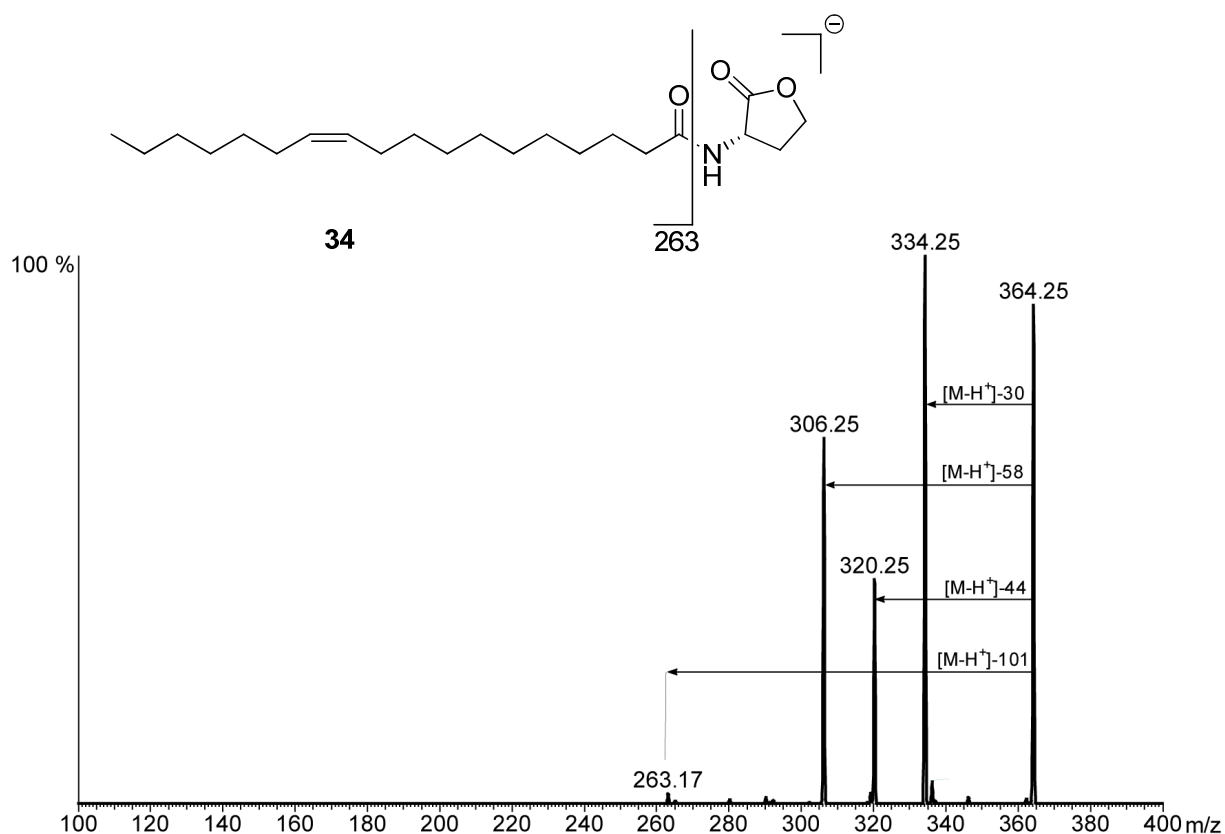


Abb. 87 ESI-MS-MS Massenspektrum von *Z*-11-C18:1-AHL **34** (ESI negativer Modus, Direkt-Injektion, 5 $\mu\text{L min}^{-1}$)

Bei der Fragmentierung von (2*E*,11*Z*)-(2,11-Octadecadienoyl)-L-homoserinlaktone (**35**) zeigt sich ein sehr ähnliches Bild, analog zu (*Z*)-11-Octadecanoylhomoserinlaktone (**34**)(Abb. 88). Die einzige strukturell relevante Fragmentierung stellt wieder das Seitenkettenfragment mit $m/z = 265$ dar. Ansonsten zeigen sich wieder die wiederholenden Abspaltungen von $[\text{M}+\text{H}]-18$, $[\text{M}+\text{H}]-28$, $[\text{M}+\text{H}]-32$ und $[\text{M}+\text{H}]-46$. Die Fragmentierung $[\text{M}+\text{H}^+]-119$ resultiert aus einer weiteren Abspaltung von Wasser aus dem Seitenkettenfragment $m/z = 263$.

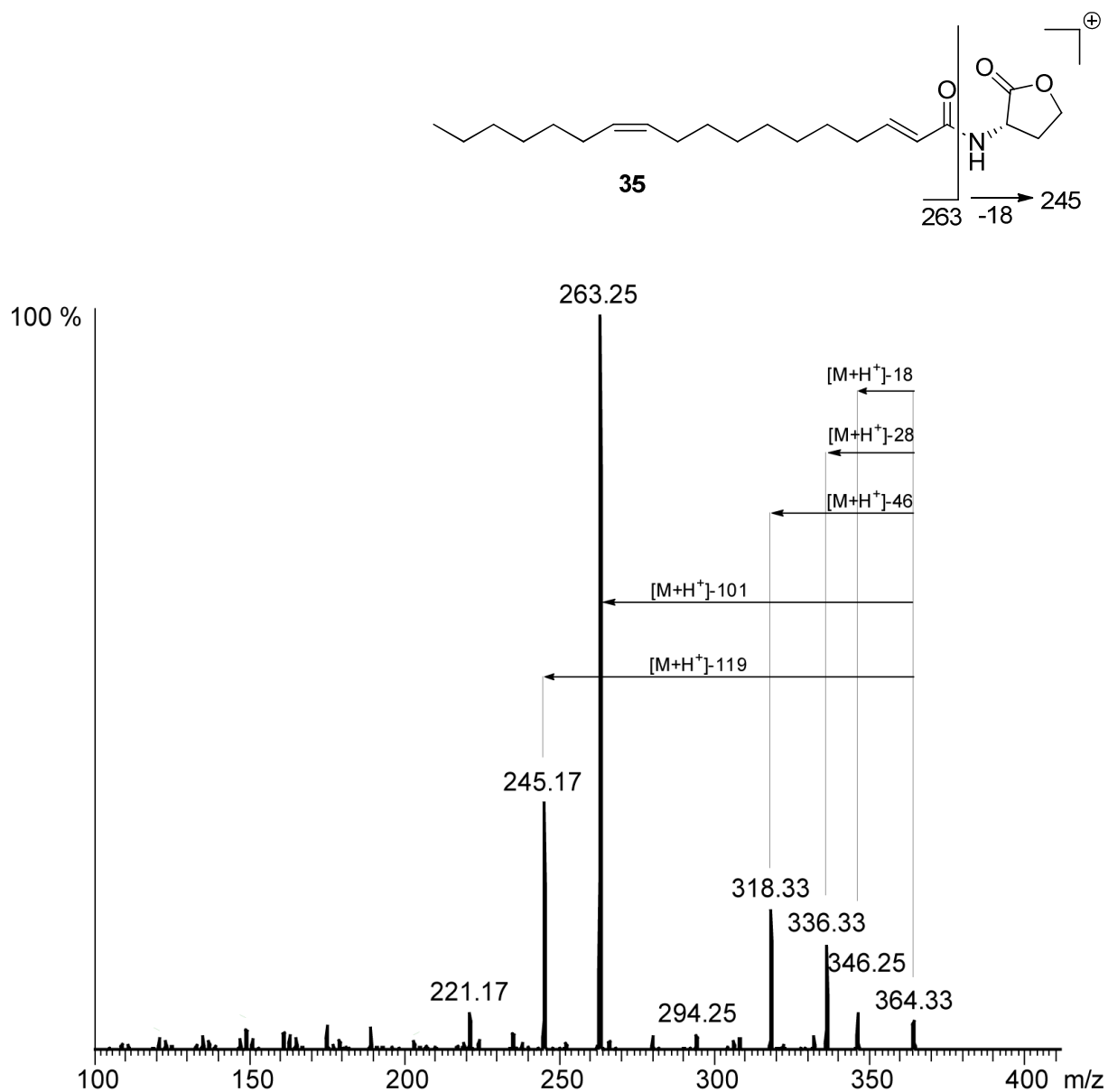


Abb. 88 ESI-MS-MS Massenspektrum von C18:2-AHL **35** (ESI positiver Modus, Direkt-Injektion, $5 \mu\text{L min}^{-1}$)

Bei negativer Ionisation ist neben den bereits mehrfach beschriebenen Abspaltungen keine weitere Fragmentierung zu erkennen.

3.4.2.3 Fragmentierung von an 3-Position substituierten AHLs

In diesem Abschnitt sollen die Fragmentierungsmuster von 3-Oxo-C6-AHLs **14** und 3-Oxo-C14-AHLs **118** sowie von 3-OH-C10-AHL **107** vorgestellt werden. Bei der positiven Ionisation von 3-Oxo-C6-AHLs **14** zeigen sich wieder die charakteristischen Fragment-Ionen $[M+H^+]-18$, $[M+H^+]-28$ und $[M+H^+]-46$ (Abb. 89). Allerdings zeigen sich hier auch die Fragment-Ionen $m/z = 102$ und $m/z = 113$. Dabei handelt es sich um Fragmente, die aus der Spaltung der Amid-Bindung resultieren. Das Fragment des Homoserinlaktonrings stellt dabei sogar das Fragment mit der höchsten Intensität dar. Beide Ionen werden durch einen Bindungsbruch zwischen der Amid-Carbonylgruppe und dem Amid-Stickstoffatom gebildet.

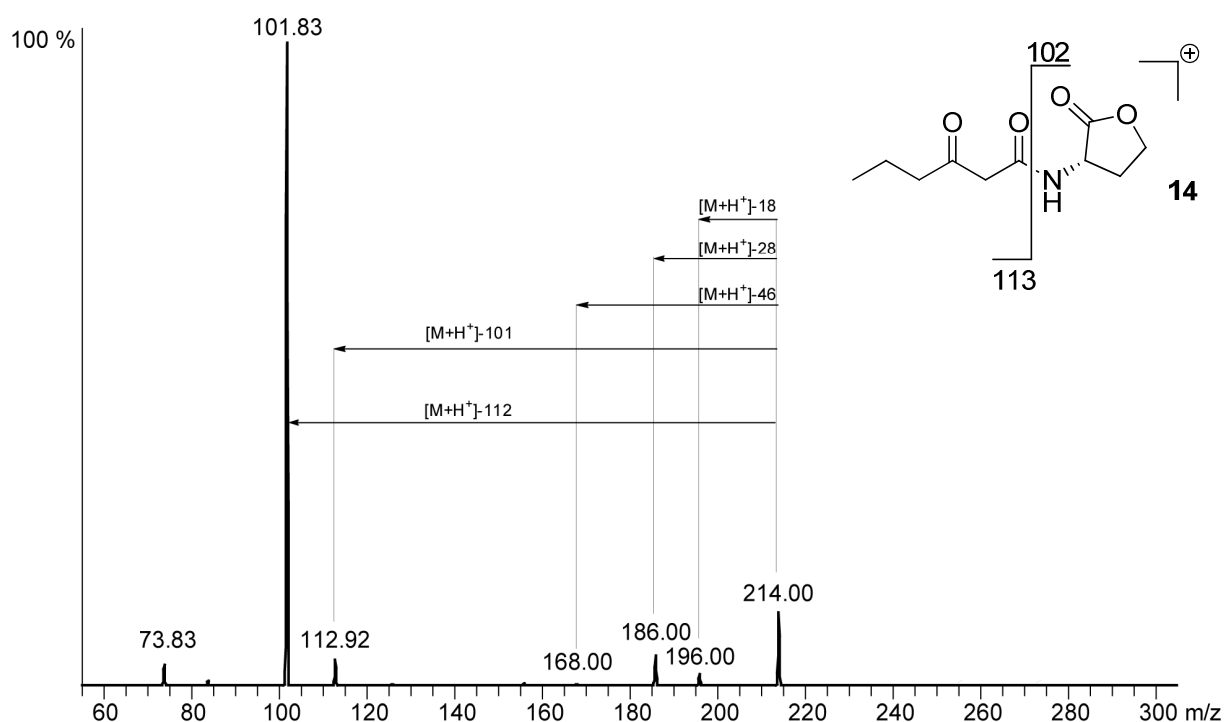


Abb. 89 ESI-MS-MS Massenspektrum von 3-Oxo-C6-AHL **14** (ESI positiver Modus, Direkt-Injektion, $5 \mu\text{L min}^{-1}$)

Bei negativer Ionisierung treten neben den bereits bekannten Fragmentierungen zwei weitere interessante Fragmente auf (Abb. 90). Dabei handelt es sich um $m/z = 87$ und $m/z = 126$. Die Fragmente kommen wahrscheinlich durch einen Bindungsbruch zwischen Amid-Stickstoffatom und Laktoneinring zustande.

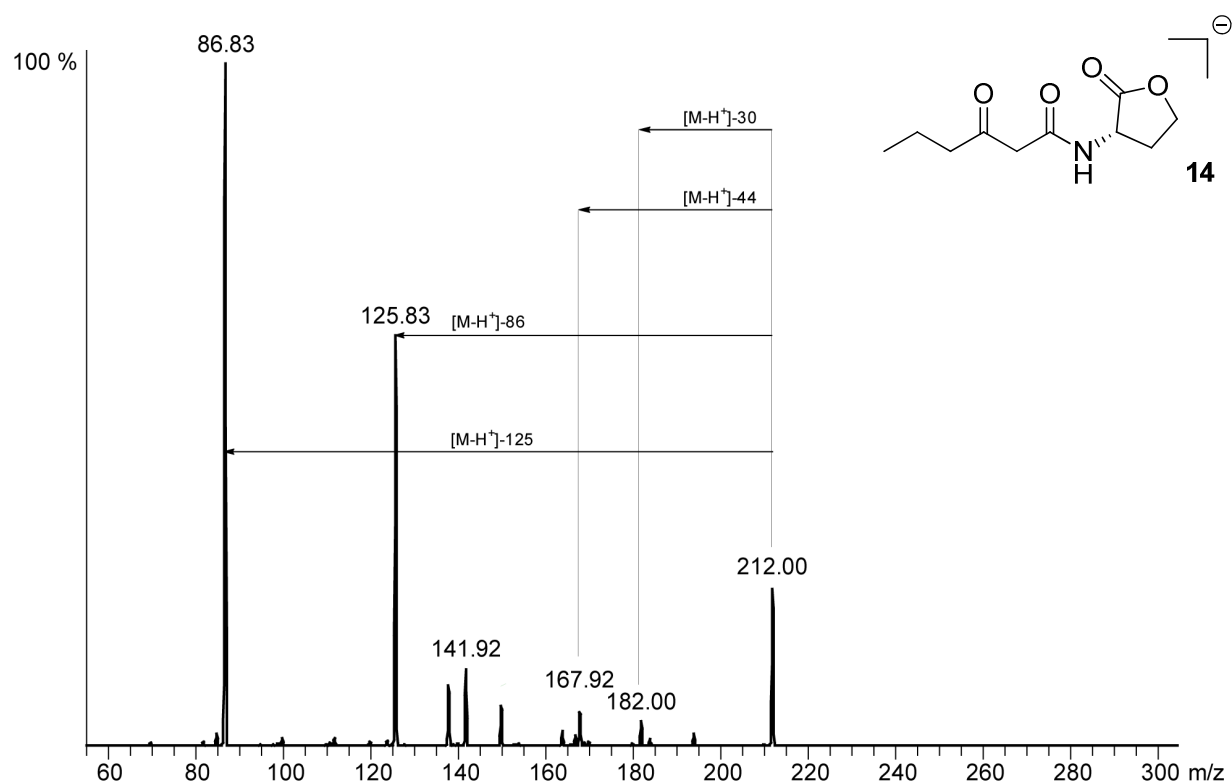


Abb. 90 ESI-MS-MS Massenspektrum von 3-Oxo-C6-AHL **14** (ESI negativer Modus, Direkt-Injektion, 5 $\mu\text{L min}^{-1}$)

Im Gegensatz zu der Fragmentierungen von 3-Oxo-C6-AHLs **14** zeigt 3-oxo-C14-AHL **118** nur eine weitere aber eher unbedeutende Abweichung (Abb. 91). Neben dem Laktonringfragment mit $m/z = 102$ zeigen sich zwei Seitenkettenfragmente mit $m/z = 225$ und $m/z = 207$, wobei letzteres durch Abspaltung von Wasser aus dem Fragment-Ion $m/z = 225$ gebildet wird.

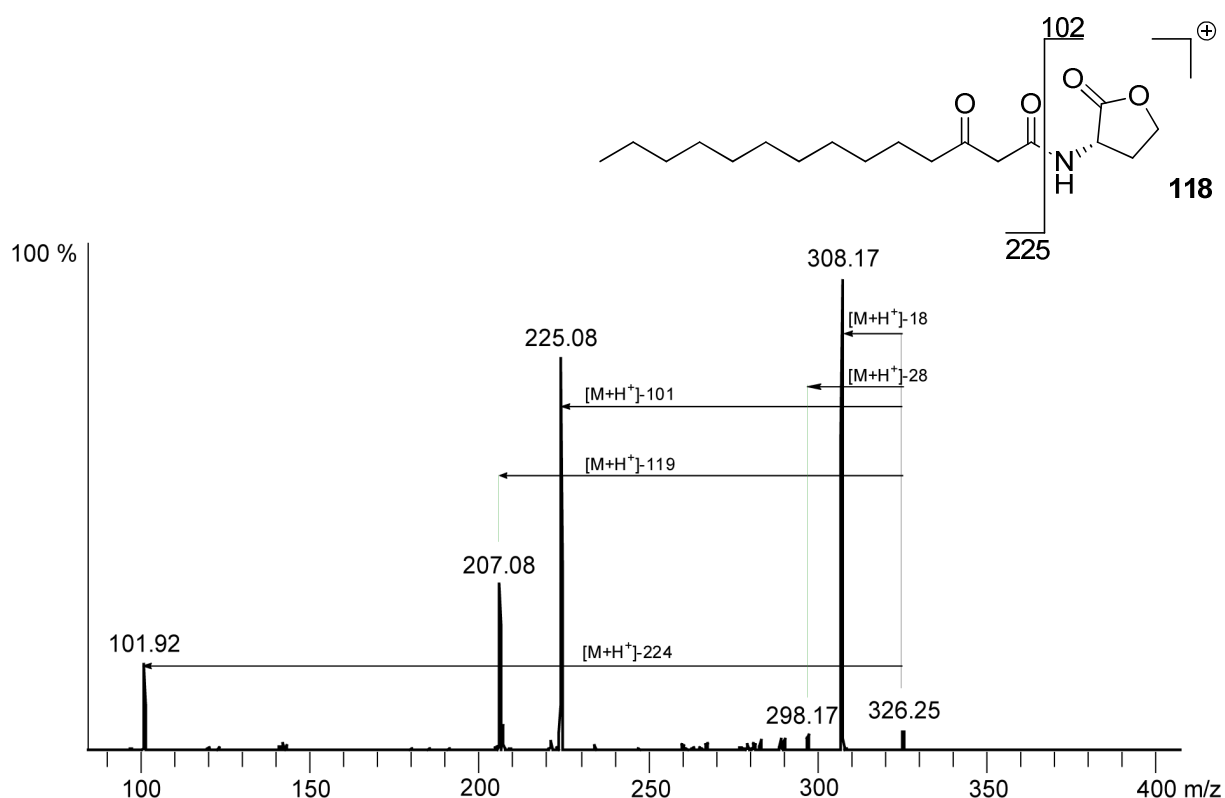


Abb. 91 ESI-MS-MS Massenspektrum des 3-Oxo-C14-AHL **118** (ESI positiver Modus, Direkt-Injektion, $5 \mu\text{L min}^{-1}$)

Die Auswertung des Massenspektrums von 3-Oxo-C14-AHL **118** mit negativer Ionisierung führt lediglich die bereits bekannten Abspaltungen kleiner Fragmente auf und ermöglicht somit keine weiterführende Interpretation der Fragmentierungsmuster. Die beobachteten Ionen des kurzkettigen 3-Oxo-C6-AHLs **14** fehlen.

Die charakteristische Fragmentierung von 3-OH-C10-AHL **107** im ESI positiven Modus ist analog zu den meisten anderen AHLs (Abb. 92). So führt die Spaltung der Amid-Bindung des 3-OH-C10-AHLs **107** zu den entsprechenden Fragment-Ion $m/z = 102$. Daneben stellt das Fragment $m/z = 153$ das dazugehörige Seitenkettenfragment dar, welches unter Abspaltung von Wasser das Fragment $m/z = 135$ bildet. Allerdings ist bereits die Fragmentierung $[M+H^+]-119$ sehr schwach ausgeprägt, so dass die Folgefragmentierung $[M+H^+]-137$ nur im Zoom zu erkennen ist.

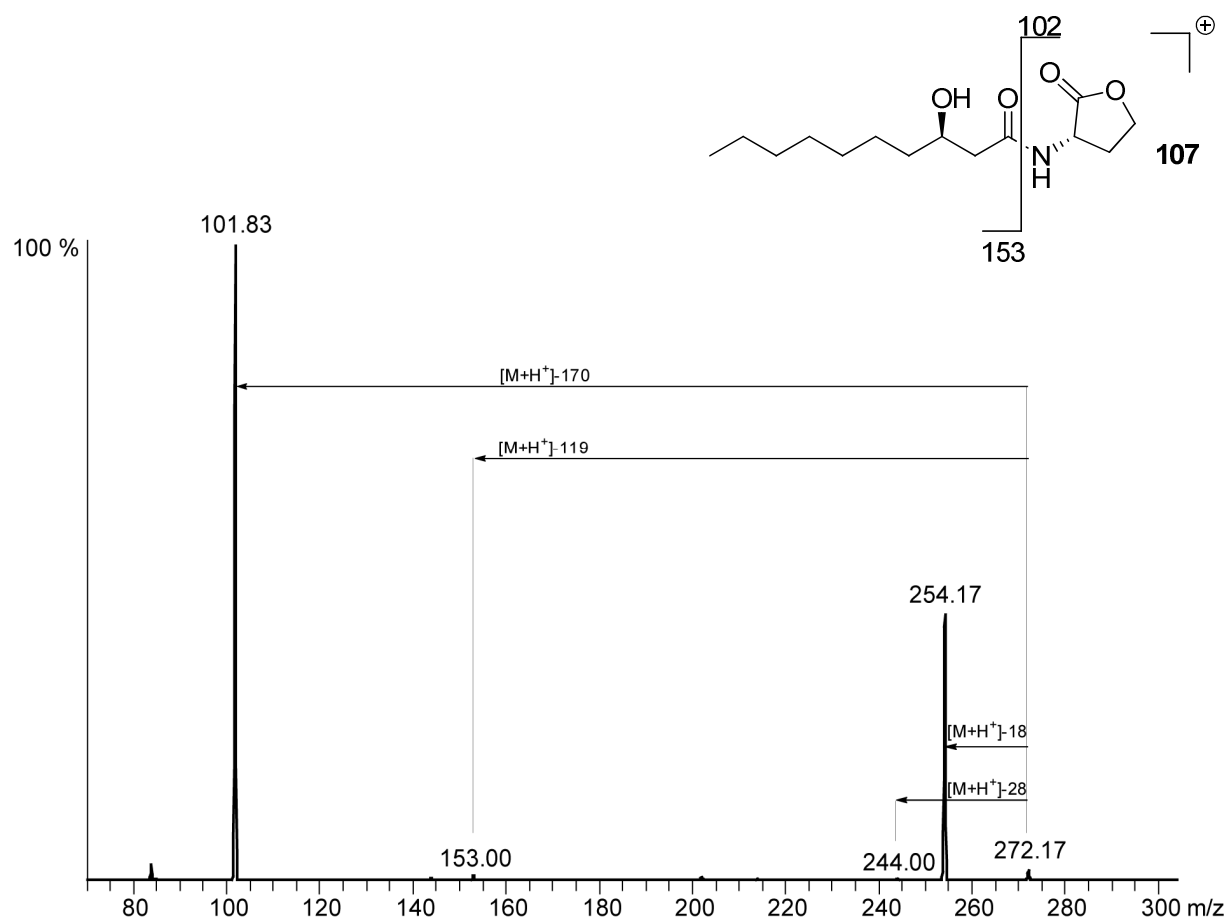


Abb. 92 ESI-MS-MS Massenspektrum von 3-OH-C10-AHL **107** (ESI positiver Modus, Direkt-Injektion, 5 $\mu\text{L min}^{-1}$)

Das Auffälligste im Massenspektrum von 3-OH-C10-AHL **107** mit negativer Ionisierung ist das Fragment-Ion $m/z = 142$ (Abb. 93). Ansonsten sind nur die üblichen Abspaltungen zu beobachten. Diese Fragmentierung lässt vermutlich auf eine Bindungsspaltung zwischen der Amid-Carbonylgruppe und Hydroxygruppe schließen.

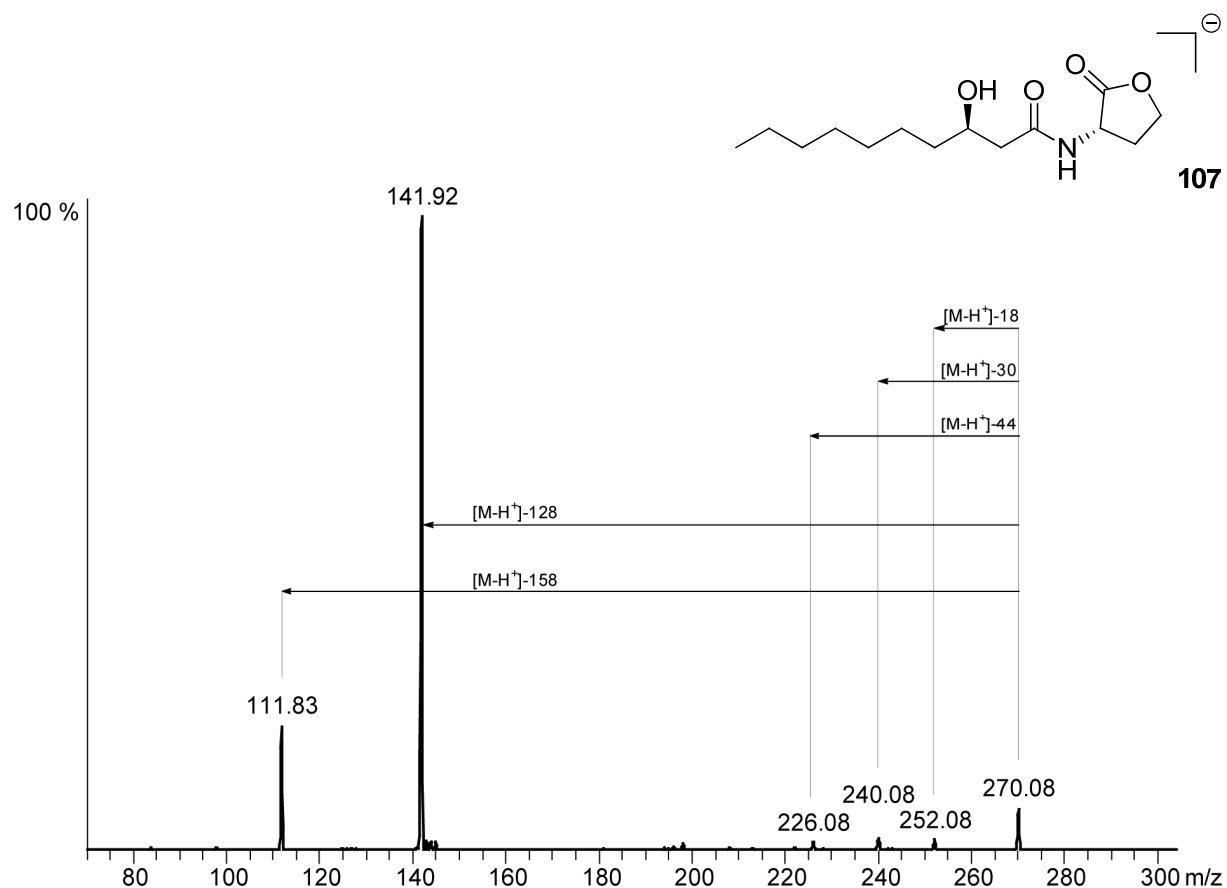


Abb. 93 ESI-MS-MS Massenspektrum von 3-OH-C10-AHL **107** (ESI negativer Modus, Direkt-Injektion, $5 \mu\text{L min}^{-1}$)

3.4.2.4 Fragmentierung von aromatischen AHLs

Als bisher einziges aromatischen AHLs ist *p*-Coumaroylhomoserinlaktone in *Silicibacter* nachgewiesen.^[67] Um eventuelle weitere AHLs zu erkennen, wurden Zimtsäure- und 4-Hydroxyphenylacetyl-AHL **119** untersucht. Zimtsäure-AHL **28** zeigt bei positiver Ionisation neben den bekannten Fragmentierungen $[M+H^+]-18$, $[M+H^+]-28$, $[M+H^+]-46$ und $[M+H^+]-58$ die Seitenkettenfragmente mit $m/z = 131$ und $m/z = 147$, wobei letzteres Ion nicht durch den Bindungsbruch an der Amidfunktion zustande kommt, sondern durch den Bindungsbruch zwischen dem Amid-Stickstoffatom und dem Laktoneinring (Abb. 94). Ebenfalls ist der Laktoneinring mit $m/z = 102$ deutlich zu erkennen.

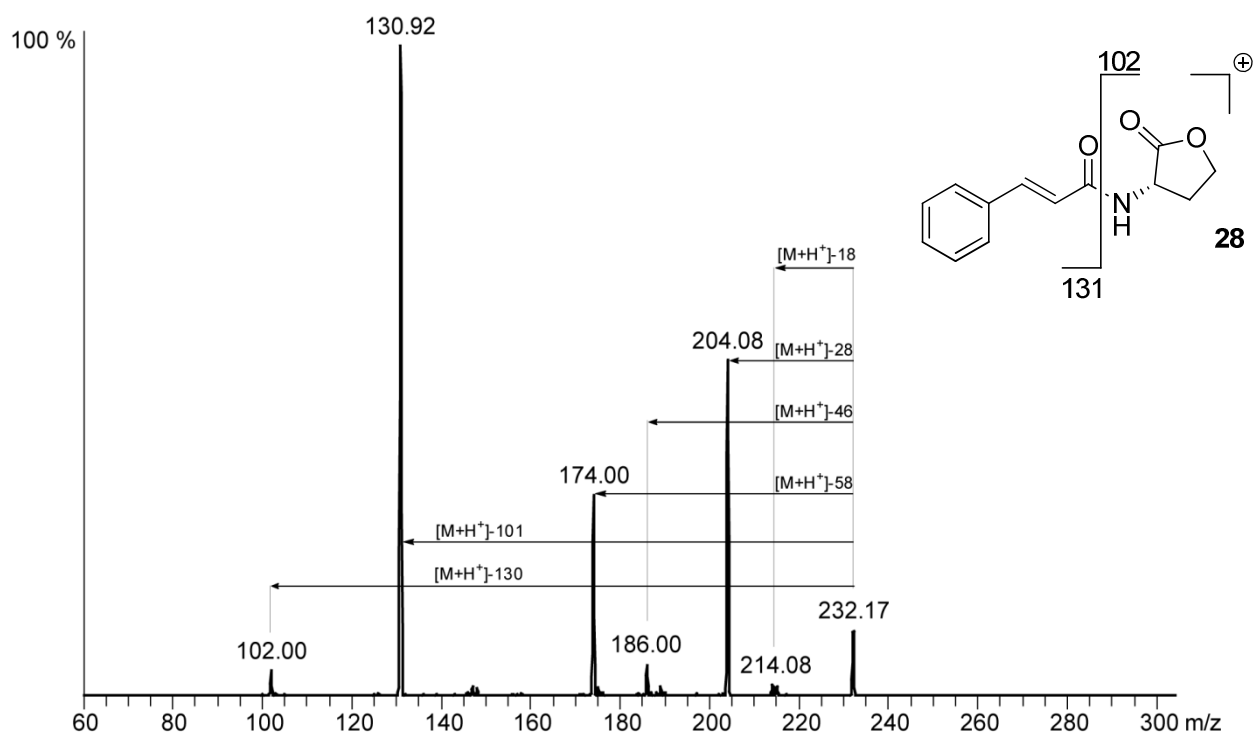


Abb. 94 ESI-MS-MS Massenspektrum von Zimtsäure-AHL **28** (ESI positiver Modus, Direkt-Injektion, $5 \mu\text{L min}^{-1}$)

Bei negativer Ionisation sind neben den Fragmentierungen $[\text{M}-\text{H}^+]-18$, $[\text{M}-\text{H}^+]-30$, $[\text{M}-\text{H}^+]-44$ und $[\text{M}-\text{H}^+]-58$ ebenfalls beide Fragmente zu beobachten (Abb. 95). Hier handelt es sich um die Fragment-Ionen $m/z = 131$ und $m/z = 126$ sowie dem Laktoneingfragment $m/z = 98$.

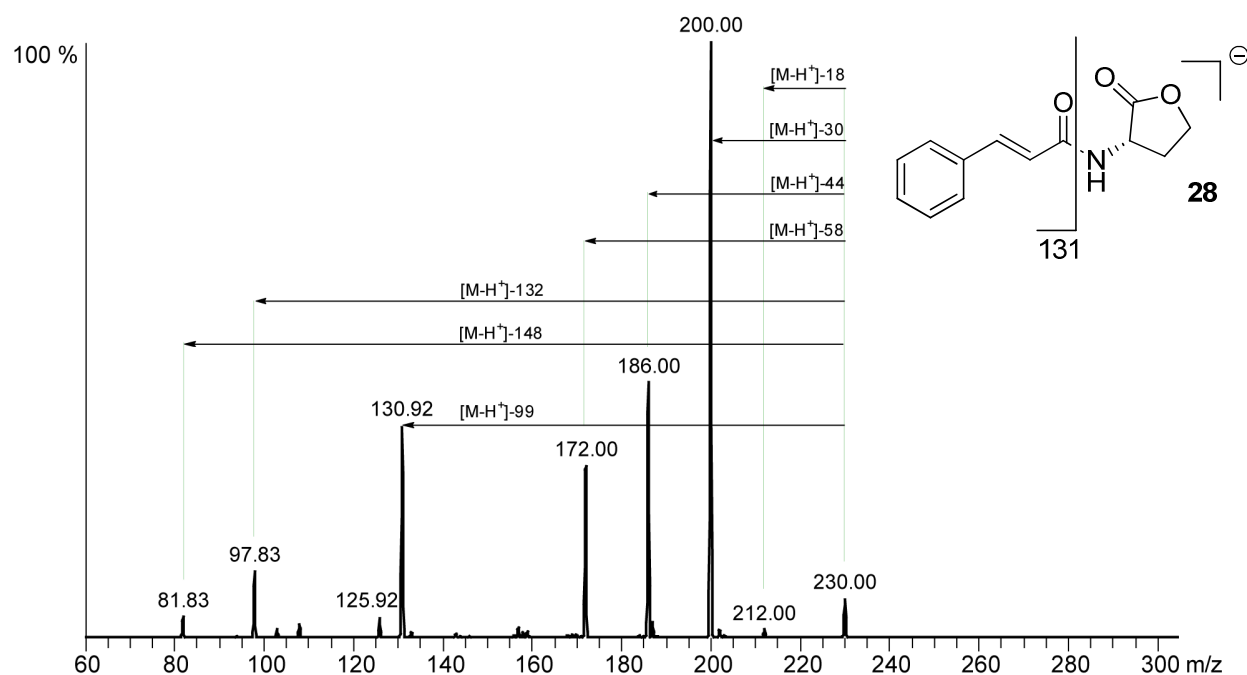


Abb. 95 ESI-MS-MS Massenspektrum von Zimtsäure-AHL **28** (ESI negativer Modus, Direkt-Injektion, $5 \mu\text{L min}^{-1}$)

Analog verhält es sich bei der Fragmentierung von 4-Hydroxyphenylacetyl-AHL **119**, welches neben den oben erwähnten klassischen Fragmentierungen das Seitenkettenfragment mit $m/z = 149$ wie auch den Laktoneinring mit $m/z = 102$ aufweist (Abb. 96). Die etwas schwächeren Fragmentierungen mit $m/z = 121$ und $m/z = 107$ sind ebenfalls auf Seitenkettenfragmente zurückzuführen, wobei sich hier um Abspaltungen von $[148+H^+]-28$ und $[148+H^+]-42$ handelt.

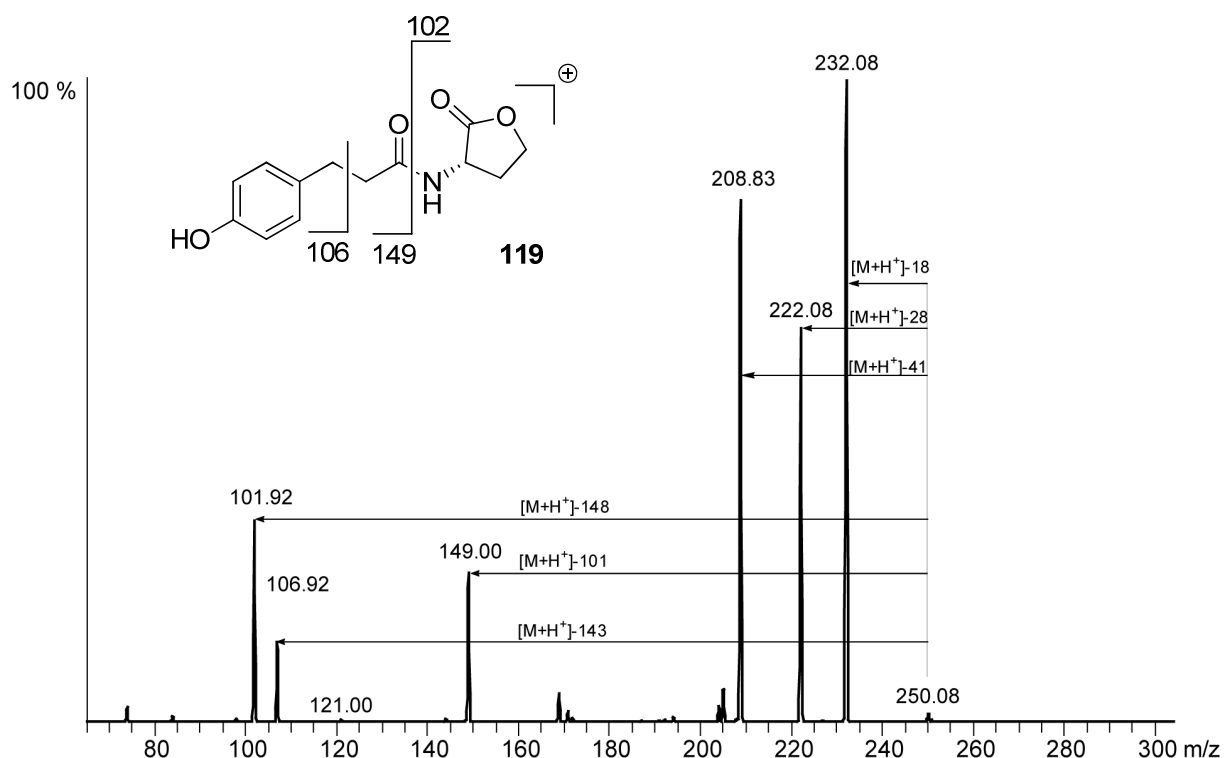


Abb. 96 ESI-MS-MS Massenspektrum des 4-Hydroxyphenylacetyl-AHL **199** (ESI positiver Modus, Direkt-Injektion, 5 $\mu\text{L min}^{-1}$)

3.4.2.5 Diskussion der ESI-Massenspektren von Homoserinlaktone

Bei den Fragmentierungen fällt als erstes auf, dass gerade bei kurzkettigen AHLs, völlig unabhängig vom Substitutionsgrad bzw. der Anzahl von Doppelbindungen, das Fragment $m/z = 102$ gebildet wird. Analog dazu findet sich auch immer das korrespondierende Seitenkettenfragment-Ion im Massenspektrum. Allerdings lassen sich darüber hinaus kaum weitere Aussagen zu der Struktur der AHL-Seitenkette mittels ESI-MS-MS machen. Die kleinen Abspaltungen beziehen sich primär auf funktionelle Einheiten am Molekül. So führen eine höhere Anzahl von Hydroxy- oder Keto-Funktionen zu einer verstärkten Abspaltung von Wasser. Allerdings lassen sich daraus nicht zwangsläufig Informationen zu der Position dieser funktionellen Gruppen im Molekül ableiten. Auf eine Oxidation in der Seitenkette lässt sich dabei durch eine Abspaltung von Wasser aus dem entsprechenden Seitenkettenfragment schließen. Bei einer Doppelbindung treten keine charakteristischen Ionen auf, welche auf die Position in der Kette hindeuten. Lediglich die geringere Masse relativ zu einer gesättigten

Seitenkette lässt, ähnlich wie auch bei GC/MS Untersuchungen, auf das Vorhandensein einer Doppelbindung schließen. Ganz ähnlich sieht dies bei aromatischen AHLs aus, welche sich ausschließlich durch ihr C/H Verhältnis in der Seitenkette verraten und über die Bestimmung der Doppelbindungsequivalente aufgeklärt werden können. Grundsätzlich ist zu den beiden Ionisationsmöglichkeiten zu sagen, dass bei positiver Ionisation der AHLs sich charakteristische Fragmente bilden können, während dies bei negativer Ionisation nicht unbedingt Fall ist. Hier lässt sich lediglich das strukturelle Element des Laktonrings bestätigen, da die Abspaltungen $[M-H^+]-18$, $[M-H^+]-30$ und $[M-H^+]-44$ bei allen AHLs auftritt, ungeachtet ihrer weiteren Substitution bzw. Oxidation in der Seitenketten (Abb. 97).

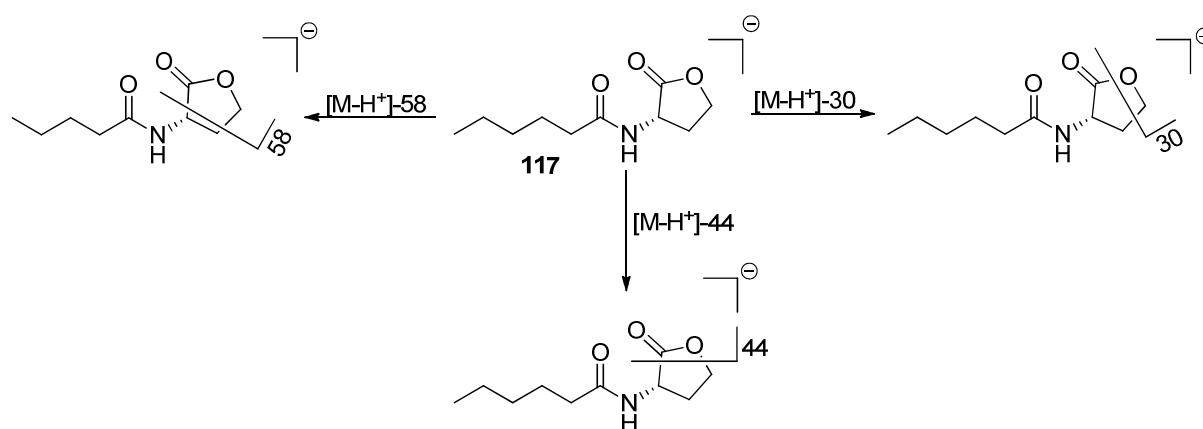


Abb. 97 Postulierte Fragmentierungen im ESI negativen Modus am Beispiel des C6-AHLs **117**

Problematisch für den Nachweis von langkettigen AHLs ist die sinkende Intensität des Laktonringfragmentes. So zeigt sich hier analog zu den GC/MS Untersuchungen, dass sich bei steigender Seitenkettenlänge das Verhältnis von Laktonringfragment zu Seitenkettenfragment sich zugunsten der Seitenkette verschiebt. Die hier untersuchten C18-AHLs zeigen kein Laktonringfragment im ESI-MS-MS. Abschließend lässt sich sagen, dass ein Strukturvorschlag von unbekannten AHLs mittels ESI-MS-MS deutlich schwieriger als mit EI-MS ist und der Nachweis unbekannter AHLs von der Kettenlänge der Seitenkette und der Neigung zur Ausbildung des Laktonringsions $m/z = 102$ stark abhängig ist.

4. Zusammenfassung

Die in dieser Arbeit vorgestellten Modellorganismen *Dinoroseobacter shibae* DFL12 und *Phaeobacter inhibens* DSM17395 wurden bereits im Vorfeld im Rahmen des Roseobacter SFB untersucht. Die dabei offen gebliebenen Fragen wurden in großen Teilen geklärt.

Der erste Schwerpunkt dieser Arbeiten war die Aufklärung des Zusammenwirkens zwischen dem Autoinducer 3-Hydroxy-Decanoylhomoserinlaktone und der Tropodithiotsäure (Abb. 98). Die hierfür angefertigten knockout Mutanten der AHL Synthase (*raiL* Mutante) und des AHL Rezeptor-Proteins (*raiR* Mutante) wurden durch den Arbeitskreis von PD Dr. Brinkhoff (ICBM) zur Verfügung gestellt und mittels GC/MS analysiert. Die gewonnenen Ergebnisse wurden anschließend durch das Screening der Mutanten auf antibiotische Aktivität überprüft und bestätigt. Beide Mutanten zeigten aufgrund des Fehlens des AHLs bzw. des Rezeptor-Proteins keine biologische Aktivität und auch nur die *raiR* Mutante war in der Lage das 3-OH-C10-AHL zu produzieren.

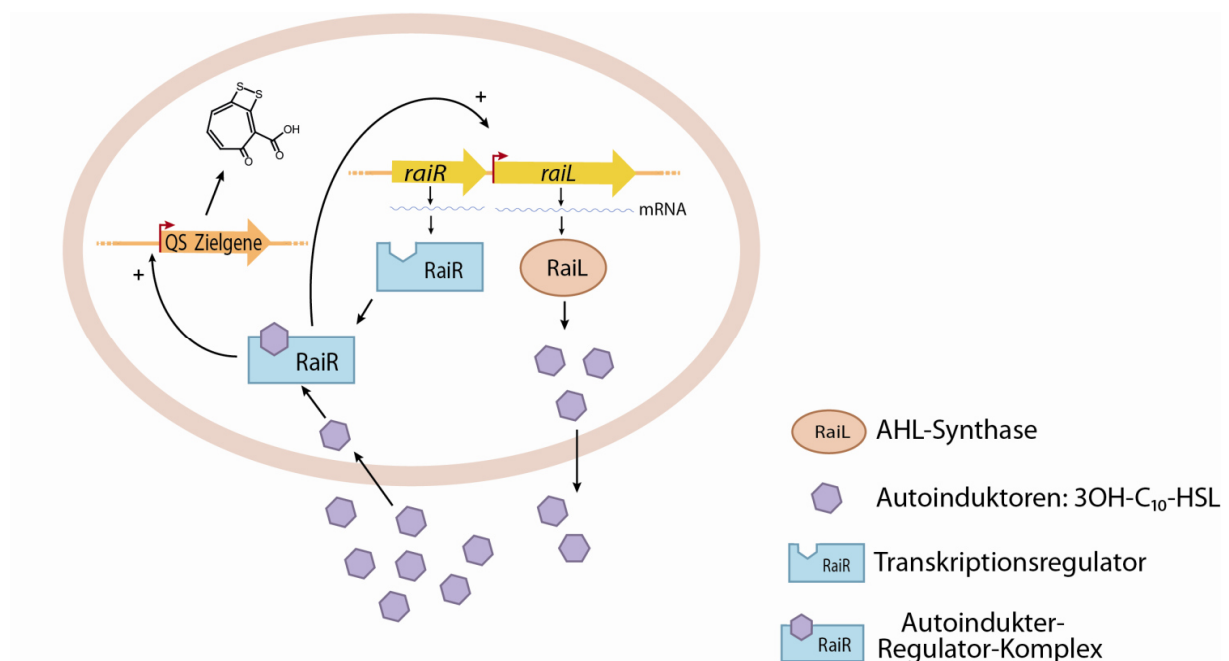


Abb. 98 Model für die Quorum Sensing abhängige TDA Produktion

Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass die für den *Phaeobacter inhibens* DSM17395 typische braune Pigmentierung in beiden Mutanten fehlte. Durch chemische Komplettation der *rail* Mutante mit dem synthetischen Signalmolekül konnte sowohl die antibiotische Aktivität wie auch die braune Pigmentierung, wiederhergestellt werden. Somit konnte eindeutig gezeigt werden, dass das *rail* Gen für die Produktion des Autoinducer und das RaiR-Protein zusammen mit dem AHL essentiell für die Produktion der TDA ist. Untersuchungen die Struktur des braunen Pigmentes aufzuklären, wobei es sich nach aktueller Kenntnis um ein Siderophor handelt, waren nicht erfolgreich.

Vorangegangene Untersuchungen von *Dinoroseobacter shibae* DFL12 haben gezeigt, dass dieses Bakterium langkettige AHLs produziert. Allerdings konnte die postulierte Struktur des C18:2-AHL bisher nicht verifiziert werden. Dieses AHL wurde in dieser Arbeit synthetisiert und mit dem natürlich vorkommenden Autoinducer verglichen. Hierbei konnte die Struktur als (2*E*,11*Z*)-(2,11-Octadecadienoyl)-L-homoserinlaktone **35** bestätigt werden. Die Struktur des zweiten AHLs wurde als *Z*-(11-Octadecadienoyl)-L-homoserinlaktone **34** aufgeklärt.

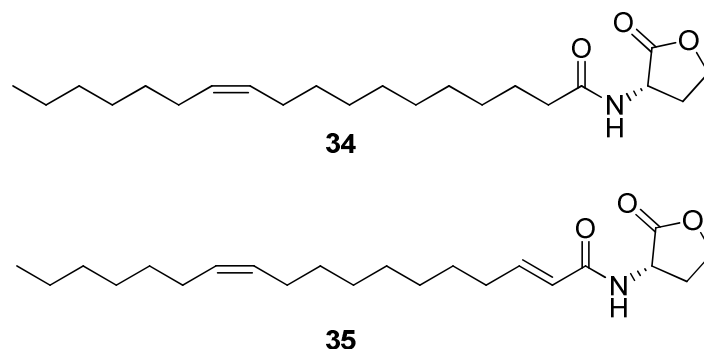


Abb. 99 Struktur der beiden aufgeklärten Signalmoleküle aus *Dinoroseobacter shibae*

Zudem sollte geklärt werden, welche Signalmoleküle von den drei identifizierten *luxI* Genen produziert werden. Die GC/MS Analyse der in *Escherichia coli* exprimierten *luxI* Gene sollte diese Information liefern, da dieses Bakterium selbst nicht in der Lage ist, AHLs zu produzieren. Diese und weitere Mutanten wurden von der Arbeitsgruppe Dr. Irene Wagner-Döbler (HZI) bereitgestellt. Interessanterweise zeigten die Ergebnisse, dass sowohl die Extrakte von der *luxI1* als auch der *luxI2* Mutante verschiedene AHLs enthielt, allerdings bis

auf das C18:1-AHL **34** keine Signalmoleküle, die dem *Dinoroseobacter shibae* DFL12 zugeordnet werden konnten. Die *luxI3* Mutante zeigte keine AHLs. Dies passt teilweise zu den Ergebnissen, die aus den *D. shibae* Mutanten gewonnen wurden. Hierfür wurde jeweils nur ein einziges *luxI* Gen ausgeschaltet, so dass noch zwei dieser *luxI* Gene aktiv waren. Es zeigte sich, dass alle Mutanten ohne das *luxI1* Gen keine AHLs produzierten. War dieses in den Mutanten vorhanden, konnten in den GC/MS Chromtagrammen C18:1-AHL **34** und C18:2-AHL **35** nachgewiesen werden. Somit lässt sich zusammenfassen, dass das *luxI1* Gen essentiell für die Produktion von AHLs in *Dinoroseobacter shibae* DFL12 ist. Das *luxI2* Gen scheint ebenfalls AHLs zu produzieren, wie die *E. coli* Mutanten gezeigt haben. Einzig für das *luxI3* Gen, welches im Gegensatz zu den anderen beiden *luxI* Genen nicht im Kerngenom sondern auf einem Plasmid lokalisiert ist, konnte kein Nachweis der Produktion von Signalmolekülen gefunden werden. Der Phänotyp der $\Delta luxI1$ Mutante unterscheidet sich deutlich vom *D. shibae* Wildtyp, welcher durch Zugabe des synthetisierten C18:2AHL wiederhergestellt werden konnte. Durch Zugabe von C18AHL, welches nicht vom Wildtyp produziert wird, fand eine teilweise Wiederherstellung der Zellmorphologie statt. Somit konnte nicht nur gezeigt werden, dass C18:1AHL und C18:2AHL von *Dinoroseobacter shibae* DFL12 produziert wird, sondern dass das Signalmolekül einen großen Einfluss auf die Entwicklung der Zellen hat und dass das Bakterium sehr spezifisch auf die eigenen AHLs reagiert.

Zusätzlich sollte anhand vom *Dinoroseobacter shibae* DFL12 untersucht werden, inwieweit eine Symbiose mit einer Alge die Produktion möglicher Sekundärmetabolite beeinflusst. Hierfür wurde das Bakterium mit dem Dinoflagellat *Prorocentrum minimum* und der Mikroalge *Isochrysis galbana* kultiviert. Untersuchungen der gewonnenen Headspace- und XAD-Extrakte zeigte eine bisher nicht beschriebene Verbindungskategorie, die alkylierten Phenylacetate. Insgesamt konnten in dieser Arbeit die Strukturen zwei der drei auftretenden Metabolite aufgeklärt werden (Abb. 100).

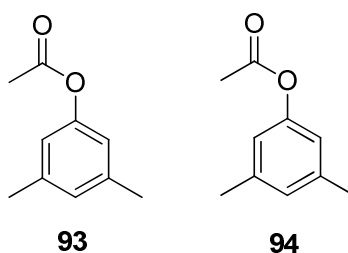


Abb. 100 Struktur der beiden aufgeklärten Sekundärmetabolite aus *Dinoroseobacter shibae* in Co-Kultur mit *Prorocentrum minimum* und *Isochrysis galbana*

Die Analytik der Naturproben wurde bisher hauptsächlich mittels GC/MS durchgeführt. Die Identifizierung der Metaboliten erfolgte anschließend durch Interpretation und Abgleich der EI-MS Fragmentierungen und der Retentionszeiten sowie der nachfolgenden Synthese der Verbindung. Dieses Verfahren setzt allerdings eine gewisse Flüchtigkeit der Verbindungen voraus, so dass nicht alle Komponenten in einem Naturextrakt detektiert wurden. Neben der Möglichkeit der Derivatisierung sollte die Analytik der Naturproben mittels HPLC/MS diese bisher verborgenen Metabolite erschließen sowie eine verlässliche Methode zum Nachweis von bereits aus dem GC/MS bekannten Verbindungen erarbeitet werden. Dabei wurden diverse AHLs über Direktinfusion per MSⁿ sowohl bei ESI negativer als auch ESI positiver Ionisierung fragmentiert und die dabei entstandenen Fragmentierungsmuster analysiert. Interessanterweise ähnelt bei ESI positiver Ionisierung die Fragmentierung der Signalmoleküle der im EI-MS. So stellt der Bindungsbruch zwischen Amid-Stickstoff und Amid-Carbonylgruppe die wohl eindeutigste Fragmentierung dar. Ansonsten sind vor allem Wasserabspaltungen zu beobachten, abhängig von der Anzahl weiterer Hydroxy- bzw. Oxo-Modifikationen in der Seitenkette. Allerdings lassen sich über diese Abspaltungen keine Aussagen über die Lage dieser Oxidationen machen. Das Vorhandensein von Doppelbindungen in der Seitenkette beeinflusst das Fragmentierungsverhalten nicht. Bei ESI negativer Ionisierung sind fast ausschließlich die Fragmentierungen des Laktonrings zu beobachten. Fragmentierungen der Seitenkette, wie sie bei ESI positiver Ionisierung beobachtet wurden, beschränken sich ausschließlich auf den Bindungsbruch zwischen Amid-Stickstoff und der Amid-Carbonylgruppe. Auf diese Weise lassen sich die AHLs mittels HPLC/MS zwar nachweisen, einen möglichen Strukturvorschlag ist aufgrund des Fehlens

charakteristischer Fragmente wie aus dem EI-MS nur aufgrund der Masse des Moleküles und des Seitenkettenfragmentes möglich. Eine Identifizierung von unbekannten Metaboliten aus den Extrakten der Bakterien war allerdings nicht erfolgreich, da aufgrund der niederaufgelösten Masse und des Fehlens von Datenbanken bei einer zu hohen Anzahl von potentiellen echten Verbindungen keine ausreichenden Informationen gewonnen werden konnten. So konnte durch Optimierung von Peak-Detektionsparameter die Zahl der möglichen Komponenten eingegrenzt werden, die Fragmentierung dieser Masse aufgrund der häufig sehr geringen Konzentration aber nicht durchgeführt werden. So ergab sich durch die Experimente letztlich nur eine Liste von Massen mit der entsprechenden Retentionszeit ohne weitere strukturelle Information.

5. Experimenteller Teil

5.1 Allgemeine Informationen

Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Acros, Sigma-Aldrich, Merck, Alfa Aesar und Fluka käuflich erworben. Sie wurden sofern nicht anders beschrieben ohne weitere Aufreinigung verwendet. Alle Lösungsmittel wurden vor dem Gebrauch destilliert. Reaktionen mit feuchtigkeits- und sauerstoffempfindlichen Verbindungen wurden in ausgeheizten Apparaturen unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Die dabei verwendeten Lösungsmittel wurden zuvor nach den Standardmethoden absolutiert. Naturproben wurden ausschließlich mit SupraSolv® Lösungsmitteln der Firma Merck behandelt.

Dünnschichtchromatographie (DC)

Alle dünnschichtchromatographischen Analysen erfolgten mit Fertigkieselgelfolien Polygram® SIL G/UV₂₅₄ der Firma Macherey-Nagel. Die UV-aktiven Verbindungen wurden mit ultraviolettem Licht der Wellenlänge 254 nm detektiert. Zusätzlich erfolgte eine Entwicklung mit Vanillin-Lösung mit anschließender Wärmeentwicklung.

Säulenchromatographie

Säulenchromatographische Aufreinigung und Trennung erfolgte an Kieselgel der Firma Merck (Kieselgel 60 (0.063-0.200 mm); Mesh 70-230 ASTM). Es wurde mit leichtem Druckluftüberdruck gearbeitet.

Gaschromatographische Massenspektrometrie (GC/MS)

Die gaschromatographisch-massenspektrometrischen (GC/MS) Analysen wurden mit zwei Geräten durchgeführt.

Für synthetische Verbindungen wurde ein Gaschromatograph des Typs HP 6890 in Verbindung mit einem Massenspektrometer des Typs HP 5973 Mass Selective Detector von Hewlett-Packard mit Split/Splitless-Injektor verwendet. Das Gerät war mit einer Fused-Silica-Kapillarsäule (BPX-5, 25 m x 0.22 mm i.D., 0.25 µm Filmdicke; SGE) bestückt. Als Trägergas diente Helium mit einem Volumenstrom von 1 mL pro Minute. Das Massenspektrometer hatte eine Beschleunigungsspannung von 70 eV. Sofern nicht anders angegeben wurde die Ofentemperatur fünf Minuten bei 50 °C gehalten und anschließend mit 10 °C pro Minute auf 320 °C geheizt.

Für Naturproben wurde ein Gaschromatograph des Typs 7890A gekoppelt mit einem Massenspektrometer des Typs 5975C Mass Selective Detector von Agilent Technologies mit Split/Splitless-Injektor eingesetzt. Das Gerät war mit einer Fused-Silica Kapillarsäule (HP-5ms, 30 m x 0.25 mm i.D., 0.25 µm Filmdicke; Agilent Technologies) bestückt. Als Trägergas diente Helium mit einem Volumenstrom von 1.2 mL pro Minute. Die Beschleunigungsspannung betrug 70 eV.

Die Auswertung der Chromatogramme und Massenspektren erfolgte mit Enhanced Chemstation D.02.00.237 der Firma Agilent Technologies und der Datenbank NIST MS Search 2.0.

Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (HPLC/MS)

Es wurden ausschließlich LCMS-grade Lösungsmittel und analytical grade Chemikalien für die HPLC/MS verwendet. Die zu vermessenden Extrakte wurden mit Essigsäureethylester oder Acetonitril/Wasser verdünnt. Für die Chromatographie wurden neben Wasser (A) und Acetonitril (B) eine 2% Ameisensäure_(aq)-Lösung in Methanol/Wasser 1:1 (D) verwendet. Die Trennung erfolgte mit dem Thermo Scientific Accela LC System an einer RP-18 Hypersil GOLD

(Thermo Scientific). Als Injektionsvolumen wurden 10 μL der Probe verwendet. Der Volumenstrom betrug 250 $\mu\text{L min}^{-1}$. Für die gesamte Chromatographie wurde die Mischung (D) isokratisch bei 5% des gesamten Laufmittelvolumens gehalten. Die Startkonditionen sind Wasser/Acetonitril 67.5:27.5 isokratisch für 5 min, gefolgt von einem Gradient für 10 min zu bis der Acetonitril-Anteil 92.5% beträgt. Daraufhin erfolgt eine kurze isokratische Phase von 3 min. Anschließend wurde die Säule wieder auf die Startbedingungen konditioniert. Als Massenspektrometer wurde ein Elektrospray LTQ XL von Thermo Scientific verwendet. Die Tune-Datei für die Konfiguration der HESI und der nachfolgenden Linsen im Massenspektrometer wurden im Vorfeld der HPLC/MS-Messung mittels Infusion erstellt. Die Capillary Temperatur betrug 275 °C. Als HESI Temperatur wurden 40 °C verwendet. Die beiden Gasströme Sheath Gas und Aux Gas betrugen 15 bzw. 10 mL min^{-1} . Die Spannung an der HESI für positive Polarität betrug 6 kV, für negative Polarität 4 kV.

Die Auswertung der Chromatogramme und Massenspektren erfolgte mit Thermo Xcalibur 2.2, Thermo Scientific Mass Frontier 7.0, Formulator und ACD/MS Workbook Suite.

Kernresonanzspektroskopie (NMR)

NMR-Spektren wurden mit den folgenden Instrumenten aufgenommen: BRUKER DPX-200 (^1H -Resonanzfrequenz = 200 MHz, ^{13}C -Resonanzfrequenz = 50 MHz), DRX-300 (^1H -Resonanzfrequenz = 300 MHz, ^{13}C -Resonanzfrequenz = 75 MHz), DRX-400 (^1H -Resonanzfrequenz = 400 MHz, ^{13}C -Resonanzfrequenz = 100 MHz) oder AV II-600 (^1H -Resonanzfrequenz = 600 MHz, ^{13}C -Resonanzfrequenz = 150 MHz). Die chemische Verschiebung ist in ppm relativ zu dem verwendeten internen Standard Tetramethylsilan ($\delta = 0$) angegeben. Die NMR-Daten wurden mit der Software ACD/Labs 12.0 ausgewertet.

Kultivierung von Roseobakterien mit XAD-16

Vor dem Einsatz des Adsorbens XAD-16, musste dieses aufgrund von Verunreinigung in einer Soxhlett Apparatur aufgereinigt werden. Dafür wurde das XAD-16 mit Acetonitril, Methanol und Diethylether jeweils für 6 h gewaschen. Bevor das so aufgereinigte XAD zu den Bakterienkulturen gegeben wurde, erfolgte die Autoklavierung in Methanol.

Die Kultivierung der Roseobakterien erfolgte in 100 mL Medium, welches entsprechend der Packungsbeschreibung hergestellt wurde (marine broth, Carl Roth). SWM Medien wurden von der Arbeitsgruppe WAGNER-DÖBLER (HZI) zur Verfügung gestellt. Für die Vorkultur wurde das zu untersuchende Bakterium auf eine MB-Agar Agar Platte ausgestrichen und eine vereinzelte Bakterienkolonie in die vorbereitete Vorkulturlösung gegeben. Zu den 100 mL Kulturvolumen wurden 2g XAD-Harz und 10 mL der entsprechenden Vorkultur hinzugegeben. Die Kultivierung erfolgte bei 28 °C für 24 h. Anschließend wurde die Lösung filtriert und das Adsorberharz mit Dichlormethan/Wasser 10:1 dreimal gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und gaschromatographisch analysiert.

5.2 Derivatisierung von Naturproben

5.2.1 Silylierung mit MSTFA

In einem Analysengläschen wurde die Probesubstanz in etwa 50 µL Dichlormethan aufgenommen und mit 50 µL N-Methyl-N-trimethylsilylfluoroacetamid (MSTFA) versetzt. Das Gefäß wurde geschlossen und eine Stunde auf 60 °C erhitzt. Anschließend wurde das Lösemittel und das überschüssige Derivatisierungsreagenz bei 50 °C im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und mittels GC/MS analysiert.

5.2.2 Derivatisierung mit Ethylchlorformiat

In einem Schraubdeckelgläschen wurden etwa 50 µg Probensubstanz in 100 µL eines Gemisches aus Wasser, Ethanol und Pyridin im Verhältnis 60:32:8 vorgelegt. Es wurden 5 µL Ethylchlorformiat zugegeben und das geschlossene Reaktionsgefäß wurde für ca. 5 Sekunden geschüttelt. Anschließend wurden 100 µL Dichlormethan mit 1 % Ethylchlorformiat zugegeben. Durch vorsichtiges Klopfen auf die Laborunterlage für ca. 30 Sekunden wurde die Phasentrennung erreicht. Die organische Phase wurde mit einer Hamilton Spritze aufgenommen und über Natriumchlorid getrocknet.

5.2.3 Derivatisierung mit DMDS ^[76]

In einem Analysengläschen wurden zu 20 µL bis 50 µL in Pentan gelöster Naturprobe 50 µL frisch destilliertes Dimethyldisulfid und 10 µL frisch angesetzte Iodlösung (60 mg Iod in 1 mL Diethylether) gegeben und 24-48h auf 50 °C erwärmt. Die Lösung wurde mit einer gesättigten Na₂S₂O₃ Lösung gewaschen und die abgetrennte wässrige Phase mit Pentan extrahiert. Die organische Phase wurde über NaCl getrocknet und das Lösemittel im Stickstoffstrom entfernt.

5.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften

5.3.1 Darstellung von *N*-Acyl-L-homoserinlaktone

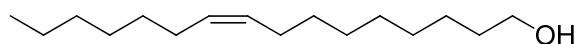
In Anlehnung an die Vorschrift von CHHABRA^[98] wurden Triethylamin (2.70 mmol), 2-Amino-4-butyrolaktone Hydrobromid (2.70 mmol) und die entsprechende Fettsäure (2.70 mmol) in einem Gemisch aus Wasser/Dichlormethan (1:1, 10 mL) suspendiert. Anschließend wurde 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid (2.70 mmol) hinzugegeben. Die Reaktion wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt und mit Dichlormethan (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (1 x 10 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde das *N*-Acyl-L-homoserinlaktone durch säulenchromatographische Aufreinigung als weißen Feststoff erhalten.

5.3.2 Darstellung der alkylierten Phenylacetate

Entsprechend der Vorschrift von YAMAMOTO^[99] wurden das alkylierte Phenol (0.81 mmol) und Diisopropylethylamin (0.90 mmol) in Dichlormethan (5 mL) suspendiert. Die Lösung wurde auf -70 °C gekühlt und frisch destilliertes Essigsäurechlorid (0.90 mmol) langsam hinzugegeben. Die Lösung wurde 3 h bei -70 °C gerührt und anschließend auf Raumtemperatur erwärmt und eine weitere Stunde gerührt. Die Reaktion wurde mit 1N HCl gequench und anschließend mit TBME (3 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit NaHCO₃ (1 x 20 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wurde das entsprechende Produkt als Flüssigkeit erhalten.

5.4 Synthesen

5.4.1 Darstellung von (Z)-Hexadec-9-en-1-ol (72)



Nach der Vorschrift von KAMISSAROV^[100] wurde Palmitoleinsäure (1.0 g, 3.93 mmol) in trockenem THF (40 mL) vorgelegt und die Lösung auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde Lithiumaluminiumhydrid-Pulver (0.09 g, 2.36 mmol) langsam zu der Suspension hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 2.5 h gerührt und mit 10 %iger HCL Lösung (25 mL) gequencht. Die Lösung wurde mit Ethylacetat (3 x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt. Das Produkt wurde als klare Flüssigkeit erhalten (0.9 g, 3.74 mmol, 95%).

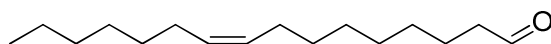
R_f = 0.42 (Pentan/TBME 20:1)

EI-MS (70 eV): m/z (%) = 222 (10), 194 (3), 166 (4), 152 (4), 138 (7), 123 (13), 109 (26), 95 (63), 82 (85), 67 (100), 55 (74), 41 (71)

¹H NMR (300 MHz,) δ [ppm] = 0.85 - 0.92 (m, 3H, CH₃), 1.20 - 1.45 (br. m., 18H, 9 CH₂), 1.51 - 1.62 (m, 2H, CH₂CH₂OH), 1.95 - 2.09 (m, 4H, 2 CH₂CH), 3.59 - 3.66 (m, 2H, CH₂OH), 5.28 - 5.41 (m, 2H, 2 CH)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 14.04 (s, 1 CH₃), 22.62 (s, 1 CH₂), 25.74 (s, 1 CH₂), 27.15 (s, 1 CH₂), 27.18 (s, 1 CH₂), 28.95 (s, 1 CH₂), 29.20 (s, 1 CH₂), 29.39 (s, 1 CH₂), 29.48 (s, 1 CH₂), 29.71 (s, 2 CH₂), 31.75 (s, 1 CH₂), 32.78 (s, 1 CH₂), 62.88 (s, 1 CH₂O), 129.78 (s, 1 CH), 129.89 (s, 1 CH)

5.4.2 Darstellung von (Z)-Hexadec-9-enal (53)

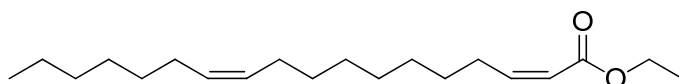


In Anlehnung an die Vorschrift von NICOLAOU^[101] wurde (Z)-Hexadec-9-en-1-ol (0.47 g, 1.95 mmol) in einer Lösung von DCM/DMSO (20 mL) im Verhältnis 1:2 suspendiert. Die Reaktion wurde auf 0 °C gekühlt und anschließend Triethylamin (1.35 mL, 9.77 mmol) und SO₃•Pyridin Komplex (1.24 g, 7.82 mmol) hinzugegeben. Nach 2 h wurde die Reaktion mit Wasser (20 mL) gequencht, anschließend mit Dichlormethan (50 mL) verdünnt und mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen (2 x 30 mL). Die Extraktion erfolgte mit Dichlormethan (3 x 30 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Durch säulenchromatographische Aufreinigung wurde das gewünschte Produkt (0.36 g, 1.52 mmol, 78 %) erhalten.

R_f = 0.35 (Pentan/TBME 20:1)

EI-MS (70 eV): m/z (%) = 220 (13) [M]⁺, 194 (3), 152 (3), 138 (9), 135 (10), 121 (28), 111 (17), 98 (48), 81 (47), 79 (49), 67 (62), 55 (87), 41 (100).

5.4.3 Darstellung von (2E, 11Z)-Octadeca-2,11-diensäureethylester (54)



In Anlehnung an die Vorschrift von BARRETT^[102] wurde Phosphonoessigsäuretriethylester (0.45 mL, 2.26 mmol) in 20 mL trockenem THF unter Stickstoffstrom vorgelegt. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und Natriumhydrid (0.07 g, 2.83 mmol) wurde hinzugefügt. Die Reaktion wurde für 30 min gerührt und anschließend (Z)-Hexadec-9-enal (0.45 g, 1.89 mmol) in THF (2 mL) tropfenweise hinzugefügt. Die Lösung wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Durch Zugabe von Wasser (5 mL) und 10 %ige HCl (5 mL) wurde die Reaktion gequencht und mit Dichlormethan (3 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten

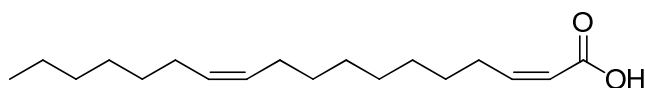
organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Durch säulenchromatographische Aufreinigung wurde das gewünschte Produkt (0.5 g, 1.62 mmol, 86 %) erhalten.

$R_f = 0.26$ (Pentan/TBME 20:1)

EI-MS (70 eV): m/z (%) = 308 (5) $[\text{M}]^+$, 263 (19), 245 (7), 234 (13), 226 (24), 220 (48), 213 (16), 195 (15), 181 (16), 167 (15), 150 (35), 135 (42), 127 (55), 114 (39), 108 (55), 95 (77), 81 (100), 67 (87), 55 (94), 41 (86)

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 0.77 - 0.86 (m, 3H, CH_3) 1.16 - 1.31 (m, 21H, 9 CH_2 , 1 CH_3) 1.85 - 2.01 (m, 4H, 2 CH_2) 2.57 (qd, $J = 7.4$, $J = 1.77$ Hz, 2H, CH_2) 4.09 (q, $J = 7.4$ Hz, 2H, CH_2) 5.24 - 5.31 (m, 2H, 2 CH) 5.68 (dt, $J = 11.5$, $J = 1.71$ Hz, 1H, CH) 6.14 (dt, $J = 11.5$, $J = 7.5$ Hz, 1H, CH)

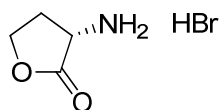
5.4.4 Darstellung von (2E,11Z)-Octadeca-2,11-diensäure (56)



Entsprechend der Vorschrift von BROWN^[103] wurde (2E, 11Z)-Octadeca-2,11-diensäureethylester (0.5 g, 1.62 mmol), Natriumhydroxid (0.65 g, 16.2 mmol) und Natriumhydrogencarbonat (0.16 g, 1.95 mmol) in einem Ethanol / Wasser Gemisch (1:4, 20 mL) suspendiert. Die Reaktion wurde über 3 h unter Rückfluss erwärmt. Die Lösung wurde mit Dichlormethan (1 x 20 mL) extrahiert und die wässrige Phase anschließend mit 10 %iger Salzsäure angesäuert. Die angesäuerte Lösung wurde mit Ethylacetat (4 x 25 mL) extrahiert und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Produkt wurde nach dem Entfernen der Lösungsmittel am Rotationsverdampfer als Feststoff (0.33 g, 1.17 mmol, 72 %) erhalten.

EI-MS (70 eV): m/z (%) = 280 (2) $[\text{M}]^+$, 262 (2), 220 (11), 198 (2), 150 (5), 135 (8), 123 (8), 121 (8), 109 (19), 99 (17), 95 (29), 81 (39), 69 (35), 67 (46), 55 (80), 43 (60), 41 (100)

5.4.5 Darstellung von L-Homoserinlaktone Hydrobromid (55)

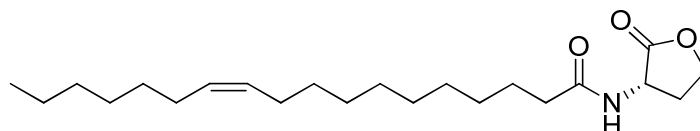


Nach der Vorschrift von VAN DER DONK^[104] wurden L-Methionin (5.0 g, 33.51 mmol) und Bromessigsäure (2.90 mL, 40.21 mmol) in einem Gemisch aus Wasser (20 mL), Isopropanol (20 mL) und Essigsäure (8 mL) suspendiert. Nachdem sich alle Feststoffe bei 50 °C gelöst haben wurde für 3 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in Dioxan (10 mL) gelöst. Nach 1 h wurde die Lösung filtriert und der erhaltene Feststoff (3.96 g, 21.78 mmol, 65 %) am Hochvakuum getrocknet.

$R_f = 0.76$ (Ethanol/Wasser 5:1)

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 8.91 (bs, 3H, NH_3), 4.42 (dd, 1H, OCH_2), 4.33 (m, 1H, CHNH_3), 4.31-4.24 (m, 1H, OCH_2), 2.59-2.52 (m, 1H, CH_2), 2.48-2.27 (m, 1H, CH_2)

5.4.6 Darstellung von (Z)-N-Octadeca-11-enoyl-L-homoserinlaktone (34)



Das Produkt (0.32 mg, 0.87 mmol, 72 %) wurde entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift für die Darstellung von N-Acyl-L-Homoserinlaktone erhalten.

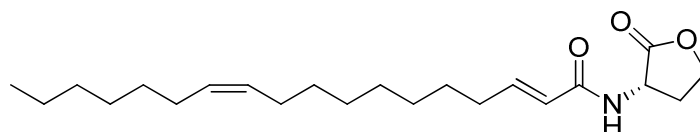
$R_f = 0.24$ (Pentan/Ethylacetat 5:1)

El-MS (70 eV): m/z (%) = 365 (15) $[\text{M}]^+$, 264 (13), 156 (27), 143 (71), 125 (13), 109 (17), 102 (100), 95 (29), 81 (35), 74 (48), 69 (47), 55 (91), 41 (55)

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 0.79 - 0.83 (t, 3H, CH_3), 1.16 - 1.29 (m, 20H, 10 CH_2), 1.57 (quin, J = 7.4 Hz, 2 H, CH_2), 1.91 - 1.97 (m, 4H, 2 CH_2), 2.08 (qd, J = 11.8 Hz, J = 8.9 Hz, 1H, CH_2), 2.18 (td, J = 7.7 Hz, J = 2.2 Hz, 2H, CH_2), 2.70 - 2.78 (m, 1H, CH_2), 4.22 (ddd, J = 11.3 Hz, J = 9.3 Hz, J = 6.0 Hz, 1H), 4.39 (t, J = 9.0 Hz, 1H, CH), 4.52 (ddd, J = 11.5 Hz, J = 8.6 Hz, J = 6.2 Hz, 1 H, CH), 5.24 - 5.31 (m, 2H, 2 CH), 6.25 (br. s., 1H, NH)

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 14.37 (s, 1 CH_3), 23.05 (s, 1 CH_2), 25.68 (s, 1 CH_2), 27.20 (s, 1 CH_2), 27.20 (s, 1 CH_2), 29.37 (s, 1 CH_2), 29.44 (s, 1 CH_2), 29.51 (s, 1 CH_2), 29.56 (s, 1 CH_2), 29.63 (s, 1 CH_2), 29.70 (s, 1 CH_2), 29.86 (s, 1 CH_2), 30.25 (s, 1 CH_2), 30.35 (s, 1 CH_2), 31.40 (s, 1 CH_2), 36.30 (s, 1 CH_2CO), 49.15 (s, 1 CHCO), 66.07 (s, 1 CH_2O), 129.85 (s, 1 CH), 129.90 (s, 1 CH), 173.61 (s, 1 NHCO), 175.61 (s, 1 CO)

5.4.7 Darstellung von (2*E*,11*Z*)-*N*-Octadeca-2,11-dienoyl-L-homoserinlaktone (35)



Das Produkt (0.12 mg, 0.33 mmol, 84 %) wurde entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift für die Darstellung von *N*-Acyl-L-Homoserinlaktone erhalten.

R_f = 0.24 (Pentan/Ethylacetat 5:1)

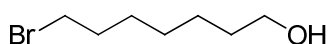
^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 0.86 - 0.90 (m, 3H, 1 CH_3), 1.24 - 1.60 (m, 18H, 9 CH_2), 1.98 - 2.04 (m, 4H, 2 CH_2), 2.17 - 2.21 (m, 2H, CH_2), 2.21 - 2.25 (m, 1H, CH_2), 2.89 - 2.95 (m, 1H, CH_2), 4.31 (ddd, J = 11.4 Hz, J = 9.3 Hz, J = 5.8 Hz, 1H, CH_2), 4.49 (td, J = 9.1 Hz, J = 1.1 Hz, 1H, CH_2), 4.60 (ddd, J = 11.7 Hz, J = 8.5 Hz, J = 5.5 Hz, 1H, CH), 5.35 (s, 2H, 2 CH), 5.82 (dt, J = 15.4 Hz, J = 1.5 Hz, 1H, CH), 6.91 (dt, J = 15.3 Hz, J = 7.0 Hz, 1H, CH)

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 14.12 (s, 1 CH_3), 22.66 (s, 1 CH_2), 27.16 (s, 1 CH_2), 27.17 (s, 1 CH_2), 27.23 (s, 1 CH_2), 28.11 (s, 1 CH_2), 28.99 (s, 1 CH_2), 29.14 (s, 1 CH_2), 29.70 (s, 1 CH_2), 29.72 (s, 1 CH_2), 29.73 (s, 1 CH_2), 30.85 (s, 1 CH_2), 31.78 (s, 1 CH_2), 32.11 (s, 1 CH_2), 49.42 (s,

1 CHCO), 66.20 (s, 1 CH₂O), 122.19 (s, 1 CH), 129.77 (s, 1 CH), 130.01 (s, 1 CH), 146.96 (s, 1 CH), 166.41 (s, 1 NHCO), 175.47 (s, 1 CO)

EI-MS (70 eV): m/z (%) = 363 (14) [M]⁺, 262 (24), 250 (8), 234 (8), 220 (10), 205 (9), 191 (9), 180 (13), 164 (15), 143 (30), 121 (23), 109 (24), 102 (19), 95 (47), 81 (100), 67 (59), 55 (90), 41 (71).

5.4.8 Darstellung von 7-Bromheptan-1-ol (59)

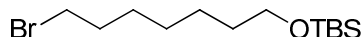


Nach der Vorschrift von RITTER^[105] wurde Lithiumaluminiumhydrid (0.18 g, 4.81 mmol) langsam zu einer eiskalten Lösung von 7-Bromheptansäureethylester (1.30 mL, 8.01 mmol) in trockenem THF (8 mL) hinzugegeben. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und für 2 h gerührt. Anschließend wurde die Reaktion mit TBME (20 mL) verdünnt und über Celite filtriert. Das Filtrat wurde mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wurde das Produkt (1.33 g, 6.81 mmol, 85 %) erhalten.

R_f = 0.28 (Pentan/Ethylacetat 10:1)

EI-MS (70 eV): m/z (%) = 150 (30), 148 (31), 109 (9), 107 (10), 97 (29), 69 (73), 67 (22), 55 (100), 43 (25), 41 (61)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 1.31 - 1.67 (m, 8H, 4 CH₂), 1.78 - 1.96 (m, 2H, 1 CH₂CH₂Br), 3.42 (t, J = 6.7 Hz, 2H, BrCH₂), 3.65 (t, J = 6.4 Hz, 2H, OCH₂)

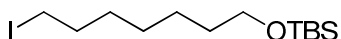
5.4.9 Darstellung von (7-Bromheptan-1-yloxy)(*tert*-butyl)dimethylsilan (57)

Es wurden nach der Vorschrift von DALLAVALLE^[106] 7-Bromheptan-1-ol (0.9 g, 4.61 mmol) in trockenem 20 mL THF suspendiert. Triethylamin (0.7 mL, 5.07 mmol), katalytische Mengen DMAP und *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (1.39 g, 9.23 mmol) wurden anschließend bei Raumtemperatur hinzugefügt und für 20h gerührt. Die Reaktion wurde mit Wasser gequench und mit TBME (4 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Durch nachfolgende säulenchromatographische Aufreinigung wurde das farblose Produkt (1.31 g, 4.24 mmol) erhalten.

R_f = 0.34 (Pentan/Ethylacetat 20:1)

EI-MS (70 eV): m/z (%) = 309 (1) [M]⁺, 307 (1) [M]⁺, 253 (2), 251 (2), 183 (18), 181 (17), 153 (16), 151 (15), 83 (98), 75 (24), 73 (15), 59 (8), 55 (100), 41 (18)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = -0.03 - 0.03 (s, 6H, 2 SiCH₃), 0.81 – 0.88 (s, 9H, 3 SiCH₃), 1.26 - 1.57 (m, 8H, 4 CH₂), 1.73 - 1.91 (m, 2H, 1 CH₂CH₂Br), 3.36 (t, J = 6.8 Hz, 2H, BrCH₂), 3.56 (t, J = 6.2 Hz, 2H, OCH₂)

5.4.10 Darstellung von (7-Iodheptan-1-yloxy)trimethylsilan (58)

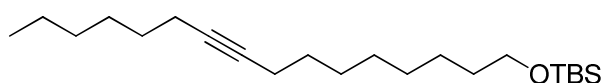
Nach der Vorschrift von KOBMEHL und FROHBERG^[107] wurde (7-Bromheptan-1-yloxy)(*tert*-butyl)dimethylsilan (0.9 g, 2.91 mmol) in abs. Aceton (30 mL) vorgelegt und wasserfreies Natriumiodid (0.87 g, 5.82 mmol) hinzugegeben. Anschließend wurde die Lösung 2 h unter Rückfluss erhitzt. Das während der Reaktion ausfallende Natriumbromid wurde filtriert und

das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt (1.01 g, 2.85 mmol, 98 %) wurde als Feststoff erhalten.

$R_f = 0.45$ (Pentan/TBME 20:1)

EI-MS (70 eV): m/z (%) = 356 (1) $[M]^+$, 299 (30), 229 (28), 199 (25), 171 (6), 101 (10), 83 (100), 75 (32), 73 (15), 55 (75), 41 (13)

5.4.11 Darstellung von (Hexadec-9-in-1-yloxy)trimethylsilan (51)



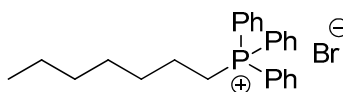
Nach der Vorschrift von MOSSET^[108] wurde 1-Octin (0.25 mL, 2.27 mmol) in trockenen THF (5 mL) vorgelegt. Die Lösung wurde auf -80 °C gekühlt und *n*BuLi (1.36 mL, 2.17 mmol) langsam hinzuge tropft und für 30 min unter Stickstoffstrom gerührt. Anschließend wurde HMPA (1.84 mL, 10.49 mmol) und (7-Iodheptan-1-yloxy)(*tert*-butyl)dimethylsilan (0.77 g, 2.17 mmol) zu der Reaktionslösung gegeben. Die Temperatur wurde langsam auf 0 °C erwärmt. Die Reaktion wurde mit 10% NH₄Cl Lösung gequencht nachdem diese über Nacht bei 0 °C gerührt wurde und mit Pentan (3 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach erfolgter säulenchromatographischer Aufreinigung wurde das Produkt (0.11 g, 0.32 mmol, 18 %) erhalten.

$R_f = 0.38$ (Pentan/TBME 20:1)

EI-MS (70 eV): m/z (%) = 352 (4) $[M]^+$, 337 (9), 295 (2), 239 (3), 221 (5), 205 (8), 165 (6), 151 (6), 137 (12), 123 (11), 109 (20), 97 (40), 83 (39), 75 (32), 69 (48), 55 (94), 43 (100)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = -0.04 - 0.03 (m, 6H, 2 SiCH₃), 0.83 (t, 3H, CH₃), 0.84 (s, 9H, SiCH₃), 1.14 - 1.58 (m, 20H, 10 CH₂), 2.09 (m, 4H, CCH₂), 3.55 (m, 2H, OCH₂)

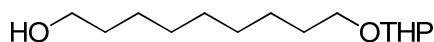
5.4.12 Darstellung von Heptyltriphenylphosphoniumbromid (61)



In Anlehnung an die Vorschrift von DOMINGUEZ^[109] wurden 2.5 mL 1-Bromheptan (15.91 mmol) in Acetonitril (25 mL) gelöst und unter Rückfluss erwärmt. In 25 mL Acetonitril gelöstes Triphenylphosphin (4.17 g, 15.91 mmol) wurde zu der Reaktion hinzuge tropft. Die Reaktion wurde für 24 h unter Rückfluss erhitzt und anschließend das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt (6.15 g, 12.73 mmol, 80 %) wurde unter Hochvakuum getrocknet und als zähe klare Flüssigkeit erhalten.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 0.76 - 0.93 (m, 3H, CH₃), 1.13 - 1.84 (m, 10H, CH₂), 3.57 - 3.82 (m, 2H, CH₂P), 7.52 - 7.98 (m, 15H, Ph)

5.4.13 Darstellung von 9-((Tetrahydro-2H-pyran-2yl)oxy)nonan-1ol (65)



Angelehnt an die Vorschrift von PRESTWICH^[110] wurde 1,9-Nonandiol (6 g, 37.44 mmol) in Dichlormethan (10 mL) vorgelegt. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und 3,4-Dihydro-2H-Pyran (0.68 mL, 7.49 mmol) und katalytische Mengen Toluolsulfonsäure hinzugegeben und für 3 h gerührt. Die Reaktion wurde mit Wasser gequench und mit Dichlormethan (3 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt (1.37 g, 5.61 mmol, 75%) wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung erhalten.

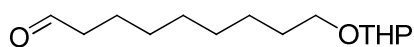
R_f = 0.18 (Pentan/TBME 20:1)

EI-MS (70 eV): *m/z* (%) = 243 (1) [M]⁺, 143 (2), 101 (20), 85 (100), 67 (14), 55 (58), 41 (38)

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 1.26 - 1.88 (m, 20H, CH_2), 3.31 - 3.94 (m, 6H, OCH_2), 4.57 (dd, 1H, CH)

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 19.73 (s, 1 CH_2), 25.44 (s, 1 CH_2), 25.70 (s, 1 CH_2), 26.13 (s, 1 CH_2), 29.62 (s, 1 CH_2), 29.81 (s, 1 CH_2), 30.15 (s, 1 CH_2), 30.70 (s, 1 CH_2), 30.73 (s, 1 CH_2), 32.70 (s, 1 CH_2), 62.90 (s, 1 OCH_2), 62.94 (s, 2 OCH_2), 98.92 (s, 1 CH)

5.4.14 Darstellung von 9-((Tetrahydro-2H-pyran-2yl)oxy)nonanal (63)

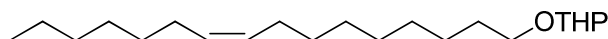


Nach der Vorschrift von SWERN^[111] wurde Oxalylchlorid (0.31 mL, 3.51 mmol) in trockenem DCM (10 mL) bei -50 °C vorgelegt. Dimethylsulfoxid (0.5 mL, 7.02 mmol) in 2.5 mL DCM wurde langsam zu der Lösung hinzuge tropft. Nach 30 min wurde 9-((Tetrahydro-2H-pyran-2yl)oxy)nonan-1-ol (0.78 g, 3.19 mmol) in 5 mL DCM tropfenweise hinzugefügt. Nach einer weiteren Stunde wurde Triethylamin (2.04 mL, 14.68 mmol) langsam zu der Lösung gegeben und die Reaktion auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend mit Wasser gequench. Die organische Phase wurde mit 5 %ige HCl-Lösung (1 x 10 mL) und gesättigter NaHCO_3 -Lösung (1 x 20 mL) gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wurde das gewünschte Produkt (0.7 g, 2.87 mmol, 90 %) erhalten.

R_f = 0.45 (Pentan/TBME 20:1)

EI-MS (70 eV): m/z (%) = 241 (1) $[\text{M}]^+$, 141 (2), 101 (23), 85 (100), 67 (9), 55 (52), 41 (56)

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 1.22 - 1.93 (m, 18H, CH_2), 2.45 (td, J = 7.2 Hz, J = 1.5 Hz, 2H, CH_2CHO), 3.31 - 3.56 (m, 2H, OCH_2), 3.67 - 3.94 (m, 2H, OCH_2), 4.52 (dd, 1H, CH), 9.72 (s, 1H, CHO)

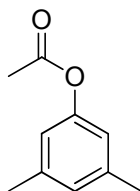
5.4.15 Darstellung von (Z)-2-(Hexadec-9-en-1-yloxy)tetrahydro-2H-pyran (64)

Entsprechend der Vorschrift von Schlosser^[112] wurden das Heptyltriphenylphosphoniumbromid (1.0 g, 2.27 mmol), Natriumamid (0.09 g, 2.27 mmol) und Kalium-*tert*-Butanolat (0.02 g, 0.21 mmol) in THF (10 mL) suspendiert und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 9-((Tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)nonanal (0.5 g, 2.07 mmol) bei -70 °C. Die Reaktion wurde langsam über Nacht erwärmt und mit Wasser gequencht. Die Lösung wurde mit Dichlormethan (3 x 20 mL) extrahiert, mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen (1 x 20 mL) und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde das Produkt (0.47 g, 1.46 mmol, 71 %) als Diastereomerenmischung (*E*:*Z* 1:2,4) erhalten.

R_f = 0.39 (Pentan/TBME 40:1)

EI-MS (70 eV): m/z (%) = 324 (1) [M]⁺, 306 (1), 262 (1), 251 (1), 222 (1), 194 (1), 183 (1), 166 (1), 138 (2), 123 (2), 109 (4), 101 (4), 95 (7), 85 (100), 67 (18), 55 (20), 41 (18)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 0.81 - 0.96 (t, 3H, CH₃), 1.18 - 1.44 (m, 18H, CH₂), 1.44 - 1.90 (m, 8H, CH₂), 2.01 (m, 4H, CHCH₂), 3.31 - 3.56 (m, 2H, OCH₂), 3.66 - 3.95 (m, 2H, OCH₂), 4.58 (m, 1H, CH), 5.31 - 5.39 (m, 2H, CH)

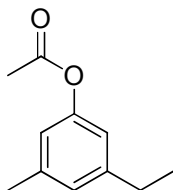
5.4.16 Darstellung von 3,5-Dimethylphenylacetat (93)

Das Produkt (0.12 mg, 0.72 mmol, 88 %) wurde entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift für die Darstellung von alkylierten Phenylacetaten erhalten.

$R_f = 0.38$ (Pentan/EE 10:1)

EI-MS (70 eV): m/z (%) = 164 (19) $[M]^+$, 122 (100), 107 (49), 91 (10), 77 (12), 43 (8)

5.4.17 Darstellung von 3-Ethyl-5-methylphenylacetat (94)



Das Produkt (0.12 mg, 0.69 mmol, 91 %) wurde entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift für die Darstellung von alkylierten Phenylacetaten erhalten.

$R_f = 0.40$ (Pentan:EE 10:1)

EI-MS (70 eV): m/z (%) = 178 (17) $[M]^+$, 136 (100), 121 (90), 108 (5), 91 (18), 77 (10), 65 (6), 51 (5), 43 (8)

6. Literaturverzeichnis

- [1] I. Wagner-Döbler, H. Biebl, *Annu. Rev. Microbiol.* **2006**, 60, 255–280.
- [2] S. Giovannoni, M. Rappé (Hrsg.: D. L. Kirchman), Wiley-Liss Inc, New York, **2000**.
- [3] J. M. Gonzalez, M. A. Moran, *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, 63, 4237–4242.
- [4] J. M. Gonzalez, R. Simo, R. Massana, J. S. Covert, E. O. Casamayor, C. Pedros-Alio, M. A. Moran, *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, 66, 4237–4246.
- [5] N. Selje, M. Simon, T. Brinkhoff, *Nature* **2004**, 427, 445–448.
- [6] M. T. Suzuki, C. M. Preston, F. P. Chavez, E. F. DeLong, *Aquat. Microb. Ecol.* **2001**, 24, 117–127.
- [7] T. Shiba, *Systematic and Applied Microbiology* **1991**, 14, 140–145.
- [8] J.-C. Cho, S. J. Giovannoni, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2004**, 54, 1129–1136.
- [9] J. M. Gonzalez, F. Mayer, M. A. Moran, R. E. Hodson, W. B. Whitman, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1997**, 47, 773–780.
- [10] J. Gosink, R. Herwig, J. Staley, *Systematic and Applied Microbiology* **1997**, 20, 356–365.
- [11] B. Lafay, R. Ruimy, de Traubenberg, C R, V. Breittmayer, M. J. Gauthier, R. Christen, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1995**, 45, 290–296.
- [12] M. Labrenz, M. D. Collins, P. A. Lawson, B. J. Tindall, G. Braker, P. Hirsch, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1998**, 48 Pt 4, 1363–1372.
- [13] Lau, Stanley C K, Tsoi, Mandy M Y, X. Li, I. Plakhotnikova, M. Wu, P.-K. Wong, P.-Y. Qian, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2004**, 54, 2281–2284.
- [14] A. Pernthaler, J. Pernthaler, M. Schattenhofer, R. Amann, *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, 68, 5728–5736.
- [15] H. Eilers, J. Pernthaler, J. Peplies, F. O. Glockner, G. Gerds, R. Amann, *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, 67, 5134–5142.
- [16] M. Suzuki, C. Preston, O. Béjà, J. de La Torre, G. Steward, E. DeLong, *Microb. Ecol.* **2004**, 48, 473–488.
- [17] M. V. Zubkov, B. M. Fuchs, S. D. Archer, R. P. Kiene, R. Amann, P. H. Burkil, *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **2002**, 49, 3017–3038.
- [18] L. Riemann, G. F. Steward, F. Azam, *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, 66, 578–587.
- [19] L. A. O'Sullivan, K. E. Fuller, E. M. Thomas, C. M. Turley, J. C. Fry, A. J. Weightman, *FEMS Microbiology Ecology* **2004**, 47, 359–370.

- [20] M. Alavi, T. Miller, K. Erlandson, R. Schneider, R. Belas, *Environ. Microbiol.* **2001**, 3, 380–396.
- [21] K. Althoff, C. Schütt, R. Steffen, R. Batel, W. E. G. Müller, *Marine Biology* **1998**, 130, 529–536.
- [22] J. B. Ashen, L. J. Goff, *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, 66, 3024–3030.
- [23] P. Patel, M. E. Callow, I. Joint, J. A. Callow, *Environ. Microbiol.* **2003**, 5, 338–349.
- [24] H. Dang, C. R. Lovell, *Environ. Microbiol.* **2002**, 4, 287–295.
- [25] H. Dang, C. R. Lovell, *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, 66, 467–475.
- [26] M. Allgaier, H. Uphoff, A. Felske, I. Wagner-Dobler, *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, 69, 5051–5059.
- [27] T. Harder, S. C. Lau, S. Dobretsov, T. K. Fang, P.-Y. Qian, *FEMS Microbiology Ecology* **2003**, 43, 337–347.
- [28] M. V. Brown, J. P. Bowman, *FEMS Microbiology Ecology* **2001**, 35, 267–275.
- [29] R. Brinkmeyer, K. Knittel, J. Jurgens, H. Weyland, R. Amann, E. Helmke, *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, 69, 6610–6619.
- [30] J. P. Bowman, R. D. McCuaig, *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, 69, 2463–2483.
- [31] M. M. Yakimov, L. Giuliano, E. Crisafi, T. N. Chernikova, K. N. Timmis, P. N. Golyshin, *Environ. Microbiol.* **2002**, 4, 249–256.
- [32] A. Buchan, J. M. Gonzalez, M. A. Moran, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, 71, 5665–5677.
- [33] A. Buchan, J. M. Gonzalez, M. A. Moran, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, 71, 5665–5677.
- [34] T. Shiba, U. Simidu, N. Taga, *Appl. Environ. Microbiol.* **1979**, 38, 43–45.
- [35] P. G. Falkowski, Z. S. Kolber, C. L. van Dover, R. A. Niederman, *Nature* **2000**, 407, 177–179.
- [36] M. A. Moran, J. M. González, R. P. Kiene, *Geomicrobiology Journal* **2003**, 20, 375–388.
- [37] A. J. Holmes, D. P. Kelly, S. C. Baker, A. S. Thompson, P. D. Marco, E. M. Kenna, J. C. Murrell, *Archives of Microbiology* **1997**, 167, 46–53.
- [38] J. M. Gonzalez, R. P. Kiene, M. A. Moran, *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, 65, 3810–3819.
- [39] J. M. Gonzalez, J. S. Covert, W. B. Whitman, J. R. Henriksen, F. Mayer, B. Scharf, R. Schmitt, A. Buchan, J. A. Fuhrman, R. P. Kiene et al., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2003**, 53, 1261–1269.
- [40] M. A. Moran, A. Buchan, J. M. González, J. F. Heidelberg, W. B. Whitman, R. P. Kiene, J. R. Henriksen, G. M. King, R. Belas, C. Fuqua et al., *Nature* **2004**, 432, 910–913.
- [41] J. M. Gonzalez, W. B. Whitman, R. E. Hodson, M. A. Moran, *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, 62, 4433–4440.
- [42] A. Buchan, E. L. Neidle, M. A. Moran, *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, 67, 5801–5809.
- [43] I. Wagner-Dobler, H. Rheims, A. Felske, A. El-Ghezal, D. Flade-Schroder, H. Laatsch, S. Lang, R. Pukall, B. J. Tindall, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2004**, 54, 1177–1184.

- [44] T. Brinkhoff, G. Bach, T. Heidorn, L. Liang, A. Schlingloff, M. Simon, *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 2560–2565.
- [45] M. R. Seyedsayamdost, R. J. Case, R. Kolter, J. Clardy, *Nature Chem.* **2011**, *3*, 331–335.
- [46] M. R. Seyedsayamdost, G. Carr, R. Kolter, J. Clardy, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 18343–18349.
- [47] M. B. Miller, B. L. Bassler, *Annu. Rev. Microbiol.* **2001**, *55*, 165–199.
- [48] J. S. Dickschat, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 343.
- [49] W. C. Fuqua, S. C. Winans, E. P. Greenberg, *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 269–275.
- [50] P. Suntharalingam, D. G. Cvitkovitch, *Trends in Microbiology* **2005**, *13*, 3–6.
- [51] E. G. Ruby, *Annu. Rev. Microbiol.* **1996**, *50*, 591–624.
- [52] M. J. Federle, B. L. Bassler, *J. Clin. Invest.* **2003**, *112*, 1291–1299.
- [53] H. B. Kaplan, E. P. Greenberg, *J. Bacteriol.* **1985**, *163*, 1210–1214.
- [54] B. A. Lazazzera, A. D. Grossman, *Trends Microbiol.* **1998**, *6*, 288–294.
- [55] C. M. Waters, B. L. Bassler, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **2005**, *21*, 319–346.
- [56] M. E. A. Churchill, L. Chen, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 68–85.
- [57] B. L. Hanzelka, E. P. Greenberg, *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 5291–5294.
- [58] D. L. Val, Cronan, J E Jr, *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 2644–2651.
- [59] M. Boyer, F. Wisniewski-Dyé, *FEMS Microbiology Ecology* **2009**, *70*, 1–19.
- [60] Beck von Bodman, S, S. K. Farrand, *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 5000–5008.
- [61] C. A. Ortori, S. Atkinson, S. R. Chhabra, M. Camara, P. Williams, D. A. Barrett, *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387*, 497–511.
- [62] B. Michael, J. N. Smith, S. Swift, F. Heffron, B. M. Ahmer, *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 5733–5742.
- [63] M. M. Marketon, M. R. Gronquist, A. Eberhard, J. E. Gonzalez, *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 5686–5695.
- [64] V. Thiel, B. Kunze, P. Verma, I. Wagner-Döbler, S. Schulz, *Chem. Eur. J. of Chem. Bio.* **2009**, *10*, 1861–1868.
- [65] J. Zan, Y. Liu, C. Fuqua, R. Hill, *IJMS* **2014**, *15*, 654–669.
- [66] I. Wagner-Döbler, V. Thiel, L. Eberl, M. Allgaier, A. Bodor, S. Meyer, S. Ebner, A. Hennig, R. Pukall, S. Schulz, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2195–2206.
- [67] A. L. Schaefer, E. P. Greenberg, C. M. Oliver, Y. Oda, J. J. Huang, G. Bittan-Banin, C. M. Peres, S. Schmidt, K. Juhaszova, J. R. Sufrin et al., *Nature* **2008**, *454*, 595–599.
- [68] A. L. Schaefer, B. L. Hanzelka, M. R. Parsek, E. Greenberg in *Methods in Enzymology*, Elsevier, **2000**.
- [69] J. T. Byers, C. Lucas, Salmond, George P C, M. Welch, *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 1163–1171.

- [70] J. J. Huang, J.-I. Han, L.-H. Zhang, J. R. Leadbetter, *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 5941–5949.
- [71] H. Biebl, M. Allgaier, B. J. Tindall, M. Koblizek, H. Lunsdorf, R. Pukall, I. Wagner-Dobler, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2005**, *55*, 1089–1096.
- [72] I. Wagner-Dobler, B. Ballhausen, M. Berger, T. Brinkhoff, I. Buchholz, B. Bunk, H. Cypionka, R. Daniel, T. Drepper, G. Gerds et al., *ISME J* **2010**, *4*, 61–77.
- [73] K. HARASHIMA, H. NAKADA, *Agricultural and Biological Chemistry* **1983**, *47*, 1057–1063.
- [74] C. N. Hunter, *The purple phototrophic bacteria*, Springer, Dordrecht, London, **2008**.
- [75] Ahmer, Brian M. M., *Molecular Microbiology* **2004**, *52*, 933–945.
- [76] P. Scribe, J. Guezennec, J. Dagaut, C. Pepe, A. Saliot, *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 928–931.
- [77] G. Knothe, Derksen, Johannes T. P., *Recent developments in the synthesis of fatty acid derivatives*, AOCS Press, Champaign, Ill, **1999**.
- [78] C. Pepe, N. Balcar, P. Dizabo, J. Dagaut, A. Saliot, R. Couffignal, H. Sayer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1995**, *9*, 1576–1579.
- [79] O. Vechorkin, D. Barmaz, V. Proust, X. Hu, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 12078–12079.
- [80] H. J. Reich, J. M. Renga, I. L. Reich, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 5434–5447.
- [81] C. A. Heil, P. M. Glibert, C. Fan, *Harmful Algae* **2005**, *4*, 449–470.
- [82] <http://www.tamug.edu/phytoplankton/images/Profiles/prorocentrum.jpg>.
- [83] D. Grzebyk, A. Denardou, B. Berland, Y. F. Pouchus, *J Plankton Res* **1997**, *19*, 1111–1124.
- [84] L. Poisson, F. Ergon, *Journal of Biotechnology* **2001**, *91*, 75–81.
- [85] <https://ncma.bigelow.org/media/catalog/product/cache/1/image/9df78eab33525d08d6e5fb8d27136e95/C/C/CCMP1323%5EB.jpg>.
- [86] M. T. Croft, A. D. Lawrence, E. Raux-Deery, M. J. Warren, A. G. Smith, *Nature* **2005**, *438*, 90–93.
- [87] N. Buddruhs, S. Pradella, M. Goker, O. Pauker, R. Pukall, C. Sproer, P. Schumann, J. Petersen, T. Brinkhoff, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2013**, *63*, 4340–4349.
- [88] T. Martens, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2006**, *56*, 1293–1304.
- [89] S. Thole, D. Kalhoefer, S. Voget, M. Berger, T. Engelhardt, H. Liesegang, A. Wollherr, S. Kjelleberg, R. Daniel, M. Simon et al., *ISME J* **2012**, *6*, 2229–2244.
- [90] V. Thiel, T. Brinkhoff, J. S. Dickschat, S. Wickel, J. Grunenberg, I. Wagner-Döbler, M. Simon, S. Schulz, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *8*, 234.
- [91] A. Penesyan, J. Tebben, M. Lee, T. Thomas, S. Kjelleberg, T. Harder, S. Egan, *Marine Drugs* **2011**, *9*, 1391–1402.

- [92] C. H. Porsby, M. A. Webber, K. F. Nielsen, Piddock, L. J. V., L. Gram, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2011**, 55, 1332–1337.
- [93] M. Berger, N. L. Brock, H. Liesegang, M. Dogs, I. Preuth, M. Simon, J. S. Dickschat, T. Brinkhoff, *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, 78, 3539–3551.
- [94] H. Geng, J. B. Bruhn, K. F. Nielsen, L. Gram, R. Belas, *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, 74, 1535–1545.
- [95] H. Geng, R. Belas, *J. Bacteriol.* **2010**, 192, 4377–4387.
- [96] M. Berger, A. Neumann, S. Schulz, M. Simon, T. Brinkhoff, *J. Bacteriol.* **2011**, 193, 6576–6585.
- [97] A. Weissberg, S. Dagan, *International Journal of Mass Spectrometry* **2011**, 299, 158–168.
- [98] S. R. Chhabra, P. Stead, N. J. Bainton, Salmond, George P. C., Steward, Gordon S. A. B., P. Williams, B. W. Bycroft, *J. Antibiot.* **1993**, 46, 441–454.
- [99] K. Ishihara, H. Kurihara, H. Yamamoto, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 3791–3793.
- [100] V. V. Komissarov, N. G. Panova, A. M. Kritzyn, *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2008**, 34, 67–73.
- [101] K. C. Nicolaou, K. R. Reddy, G. Skokotas, F. Sato, X. Y. Xiao, C. K. Hwang, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 3558–3575.
- [102] Barrett, Anthony G. M., J. Head, M. L. Smith, N. S. Stock, White, A. J. P., D. J. Williams, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 6005–6018.
- [103] C. L. Morris, Y. Hu, G. D. Head, L. J. Brown, W. G. Whittingham, Brown, Richard C. D., *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 981–988.
- [104] J.-H. Lee, B. S. Evans, G. Li, N. L. Kelleher, van der Donk, Wilfred A., *Biochemistry* **2009**, 48, 5054–5056.
- [105] J. Y. Wu, B. Moreau, T. Ritter, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 12915–12917.
- [106] R. Nannei, S. Dallavalle, L. Merlini, A. Bava, G. Nasini, *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 6277–6280.
- [107] G. Koßmehl, H.-C. Froberg, *Chem. Ber.* **1986**, 119, 50–64.
- [108] F. Caijo, P. Mosset, R. Grée, V. Audinot-Bouchez, J. Boutin, P. Renard, D.-H. Caignard, C. Dacquet, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 2006, 2181–2196.
- [109] C. Domínguez, A. G. Csáký, J. Magano, J. Plumet, *Synthesis* **1989**, 1989, 172–175.
- [110] B. Latli, G. D. Prestwich, *J. Chem. Ecol.* **1991**, 17, 1745–1768.
- [111] A. J. Mancuso, S.-L. Huang, D. Swern, *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 2480–2482.
- [112] T. Hamatani, S. Matsubara, H. Matsuda, M. Schlosser, *Tetrahedron* **1988**, 44, 2875–2881.

7. Abkürzungen

br.	breites Signal
δ	Chemische Verschiebung
d	Dublett
AAnP	aeroben anoxygenen Phototropen
ACN	Acetonitril
ACP	Acyl Carrier Protein
AHL	Acyliertes Homoserinlaktone
AI	Autoinducer
AIP	Autoinducer Protein
ATP	Adenosontriphosphat
CIP	Collection of Institut Pasteur
CLSA	Closed Loop Stripping Apparatus
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DHP	Dihydropyran
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMDS	Dimethyldisulfid
DMF	Dimethylformamid
DMS	Dimethylsulfid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSP	Dimethylsulfoniopropionat

DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EI	Electron Impact
ESI	Elektrospray Ionisation
Et	Ethyl
GC	Gaschromatographie
GC/MS	mit Gaschromatographie gekoppelte Massenspektrometrie
h	Stunde
HESI	Heated Elektrospray Ionisation
HMPA	Hexamethylphosphorsäuretriamid
HPLC	High Performance
HPLC/MS	mit Liquid Chromatography gekoppelte Massenspektrometrie
HSL	Homoserinlaktat
HZI	Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
ICBM	Institut für Chemie und Biologie des Meeres
<i>J</i>	Kopplungskonstante
kb	kilobase
LAH	Lithiumaluminiumhydrid
LDA	Lithiumdiisopropylamin
M	Multipllett
[M] ⁺	Molekularion
MB	marine broth
Me	Methyl
MS	Massenspektrometrie
MSTFA	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -(trimethylsilyl)-2,2,2-trifluoracetamid
<i>m/z</i>	Masse pro Elementarladung
<i>n</i> BuLi	<i>n</i> -Butyllithium

NMR	Kernresonanzspektroskopie
OAc	Acetat
PCC	Pyridiniumchlorochromat
ppm	parts per million
<i>p</i> TsOH	<i>p</i> -Toluolsulfonsäure
q	Quartett
qRT PCR	Real Time Quantitative Polymerase Kettenreaktion
quin	Quintett
<i>R_f</i>	ratio of fronts
RI	Retentionsindex
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT [°C]	Raumtemperatur
RT [min]	Retentionszeit
s	Singulett
SAM	S-Adenosylmethionin
SWM	artificial seawater medium
t	Triplett
TDA	Tropodithiotsäure
TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydropyran
TMS	Trimethylsilan
UV	Ultraviolett

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Stefan Schulz für die Überlassung des interessanten Themas und für die freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Thomas Lindel möchte ich mich für die Übernahme des Koreferats bedanken.

Den Kooperationspartnern PD Dr. Thorsten Brinkhoff und Prof. Dr. Irene Wagner-Döbler danke ich für die Bereitstellung der Bakterienkulturen und -extrakte.

Den Mitarbeitern der NMR- und Massenspektrometrieabteilung, sowie dem technischen Personal danke ich für die Unterstützung. Ganz besonders möchte ich Dr. Ulrich Papke für die guten Ratschläge und seine Diskussionsbereitschaft in massenspektrometrischen Belangen danken.

Für das schöne Arbeitsklima, die Diskussionsbereitschaft und für die zahlreichen Anregungen möchte ich allen Kollegen und Freunden im Arbeitskreis Schulz Dr. Thies Marten Schulze, Dr. Insa Bergmann, Dr. Verena Thiel, Dr. Thorben Nawrath, Jasmin Müller, Jana Caspers, Michael Kostka, Subhash Kumar Surapaneni, Pardha Saradhi Peram, Michael Maczka, Dr. Dennis Poth, Julia Kiefer, Ulrike Groenhagen, Florian Mann, Hilke Bruns, Anna-Lena von Rymon-Lipinski, Susann Hötling, René Röpke, Lisa Ziesche, Srinivasa Rao Ravella, Witali Schmidt und meinem Laborkollegen Martin Stürminger danken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Lebensgefährtin Jana, für ihre Motivation und Rückhalt sowie die gewissenhafte Durchsicht der Arbeit.

Meinen Großeltern danke ich für ihre Unterstützung während meines Studiums und der Promotion.